



OPTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES POR MICROALGAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Vanessa Patrícia Faria Paulo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadora: Doutora Paula Cristina Lima Varela Passarinho

Co-orientadoras: Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva

Doutora Maria Luísa Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor Alberto José Delgado dos Reis, Investigador Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P.;

- Doutora Paula Cristina Lima Varela Passarinho, Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P.

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

“Sempre chegamos ao sítio aonde nos esperam!”, o Livro dos Itinerários.

No entanto, existem caminhos árduos de percorrer por serem desconhecidos, pelas suas barreiras de hercúleos esforços, pelas encruzilhadas e desvios que nos levam a dilemas e indecisões, pelos densos rios que temos de superar. Mas, é tão bom chegar a esta fase da gesta e poder dizer que não explorei sozinha o desconhecido, que não superei os obstáculos sem uma mão amiga, que nas minhas dúvidas sempre surgiu o bom conselho a boa sugestão, que nas águas a transpor me foi lançada a ponte salvadora.

Assim, aprendi que um caminho de tão difícil necessita sempre de apoio, de conselhos, de ensinamentos diversos, por vezes de carinhos e porque não, de reprimendas e censuras.

Por tudo, e especialmente pelo rumo certo, desejo expressar o meu sincero e reconhecido agradecimento a todos os que contribuíram para a concretização deste estudo, deste sonho.

À Doutora Paula Passarinho agradeço pela orientação séria e meticulosa, pela disponibilidade em todos os momentos, pela paciência e pelas críticas construtivas. Os seus ensinamentos sempre tão sábios e ponderados foram decisivos para o desenrolar do trabalho experimental e para a elaboração desta dissertação, bem como, para os futuros caminhos que irei percorrer.

À Doutora Luísa Gouveia, ajudante preciosa na ultrapassagem de barreiras, bem como no desbravamento de caminhos, agradeço a sua amizade e todo o seu apoio e empenho a nível pessoal e também científico. Agradeço-lhe ainda todas as sugestões de trabalho e a permanente colaboração na discussão dos resultados experimentais.

Aos Professores Luísa Louro e Miguel Mourato pela amizade sincera, pela preocupação e compreensão, pelo empenhamento e presença ao longo destes meses e, por terem aberto a primeira porta para o mundo apaixonante das microalgas.

À Doutora Paula Marques, à Graça Conceição e à Natércia Sousa pelo apoio incondicional, pelos conselhos, pela companhia...pela amizade sincera!

Às colegas de laboratório Ana Baptista e Ana Marques, agradeço a amizade, o constante apoio e as dicas preciosas. Um reconhecimento especial à “coleguinha” Ana Tropecêlo pelo incansável companheirismo e pela cumplicidade. Vou sentir imensas

saudades das nossas pausas merecidas para o café e das conversas ao sol sobre tudo e sobre nada que tão bem nos sabiam...

Não posso deixar de agradecer à Doutora Susana Marques e ao Doutor César Fonseca pela disponibilidade e ajuda nos ensaios físico-enzimáticos, nos ensaios de fermentação e nas análises por HPLC.

Aos meus mais que amigos, Zé, Pedrinho, Sónia e Tiago, um obrigada do fundo do coração pela paciência, apoio e motivação. Eram vocês que ouviam as minhas “lamúrias” e me faziam sorrir mesmo em alturas onde o desespero dominava.

Ao meu namorado Pedro, um agradecimento especial pelo seu apoio permanente, expresso ou silencioso, materializado em 6 longos meses de paciência, de sacrifício e abnegação pela minha ausência quase real, pelo tempo que não viveu para não me deixar sozinha, pelas más disposições e nervosismos e pelo carinho com que sempre as suportou. Por tudo o que esse apoio representa e que eu não consigo traduzir em palavras...

E porque os últimos são os primeiros, quero deixar um agradecimento profundo aos melhores pais do mundo por sempre me iluminarem os caminhos obscuros com afecto e dedicação para que os pudesse trilhar sem medo e cheia de esperança!

RESUMO

O uso de biocombustíveis adquire grande relevância numa altura em que o mundo se depara com uma crise energética e em que as questões ambientais são a ordem do dia. As microalgas surgem como matéria-prima auspiciosa por não competirem com alimentos por terrenos aráveis ou águas potáveis e, por produzirem grandes quantidades de compostos de interesse – açúcares e lípidos, por exemplo.

A presente dissertação teve como finalidade o estudo da produção de açúcares pela microalga *Spirogyra* sp. com vista à produção de bioetanol. Para tal, procedeu-se ao cultivo desta clorófito em condições de iluminação contínua e em ciclos dia-noite (14 h/10 h), para estudar o efeito do regime de iluminação no crescimento e na acumulação de açúcares. Paralelamente, optimizaram-se métodos de ruptura celular para extracção de açúcares e seleccionaram-se leveduras adequadas para o processo fermentativo de hidrolisados de microalga.

O valor máximo de concentração atingido ocorreu no ensaio com ciclos dia-noite ($0,34 \pm 0,05$ vs. $0,29 \pm 0,02$ gL⁻¹). Todavia, a maior acumulação de açúcares ocorreu em presença de iluminação contínua (27 vs. 24 % g eq_{glu}.g biomassa⁻¹). Para esta microalga, dos métodos testados de ruptura celular, o mais adequado para o processo global, foi a hidrólise com ácido sulfúrico 2 N em autoclave durante 30 min, com rendimento de 78 %. A levedura mais promissora foi a *S. carlsbergensis* com rendimentos de 82 % para a conversão de glucose e manose, com capacidade ainda para metabolizar arabinose, uma pentose que se encontra em alguns hidrolisados.

Palavras-chave: Microalgas, *Spirogyra* sp., ruptura celular, açúcares, leveduras, bioetanol.

ABSTRACT

Nowadays, the world energy crisis and environmental issues are in order. So, the use of biofuels has gained an extraordinary importance and microalgae seem to be a promising feedstock, as they do not compete with food either for arable land or for potable water. Also, they produce several interesting compounds such as sugars and lipids.

The aim of this dissertation was the study of sugar production by *Spirogyra* sp. regarding the production of bioethanol. So, the first step was the cultivation of this chlorophyte under continuous lighting and day-night cycles (14 h/10 h), to evaluate the effect of light regime on the growth and sugar accumulation. Methods for cell rupture and sugars extraction were also studied and optimized. A yeast screening towards the production of ethanol from microalgae hydrolysates was the final step of this work.

The highest biomass concentration was attained under day-night cycles ($0,34 \pm 0,05$ vs. $0,29 \pm 0,02$ gL⁻¹) but the greatest sugar accumulation occurred in the presence of continuous illumination (27 vs. 24 % g eq_{glu}.g biomass⁻¹). From all the tested methods for cellular disruption of *Spyrogira* sp., the most appropriate was acid hydrolysis by sulfuric acid 2 N in autoclave for 30 min (78 % extracted sugars). *S. carlsbergensis* showed to be the most promising microorganism with conversion yields of 82 % for glucose and mannose. This yeast presented also the ability to use in some extent arabinose, a pentose found in algae hydrolysates.

Keywords: Microalgae, *Spirogyra* sp., cellular disruption, sugars, yeast, bioethanol.

EXTENDED ABSTRACT

The demand for clean resources to ensure future energy needs is one of the biggest challenges of nowadays. The increasing fuel prices and the international focus on the environmental impact of gas emissions have led to vigorous research initiatives aiming at developing alternative renewable and potentially carbon neutral solid, liquid and gaseous biofuels as alternative energy resources.

Liquid biofuels are being developed mainly to replace conventional liquid fuels. A recently popularized classification for liquid biofuels includes “First Generation” and “Second Generation” biofuels. The primary distinction between them lies in the feedstock used (Nigam and Singh, 2011).

The first generation liquid biofuels are generally produced from grains or seeds and require a relatively simple production processes already implemented. Its sustainability is, however, questionable because of the conflict with food supply. Second-generation liquid biofuels are produced from agricultural lignocellulosic biomass by two fundamentally different approaches, biological or thermochemical processing. The main advantage is that it limits the food *versus* fuel competition associated with first generation biofuels. Nevertheless, the feasibility of using these materials as feedstock is often limited by the high cost of the hydrolysis process needed for biomass deconstruction based on current technologies.

Thus, microalgae can be a suitable alternative feedstock for next generation biofuels because certain species contain high amounts of oil and/or carbohydrates which can be processed into transportation fuels, using currently available technologies. Also, microalgae grow faster and use far less water than food cultures and permit the use of non-arable land and non-potable water.

Taking into account that growth and chemical composition of microalgae varies with environmental conditions and nutrient availability, a particular strategy for cultivation has to be selected in each case in order to produce biomass enriched with a particular compound or with a group of them.

The aim of this dissertation was the study of sugar production by *Spirogyra* sp. regarding the production of bioethanol. So, the first step was the cultivation of this chlorophyte under continuous lighting and day-night cycles (14 h/10 h), to evaluate the effect of light regime on the growth and sugar accumulation of the microalgae.

The highest biomass concentration was attained under day-night cycles ($0,34\pm0,05$ vs. $0,29\pm0,02$ g L⁻¹) but the greatest sugar accumulation occurred in the presence of continuous illumination (27 vs. 24 % g eq_{glu} g biomass⁻¹).

This green microalga accumulates high amounts of carbohydrates. However, these compounds are not easily removed being imperative to break down the cell wall in order to release them. Therefore, cell disruption is a particularly important step and the most appropriate method a key factor for extraction efficiency and hence for the bioethanol production. In this work, physical, physico-chemical and physico-enzymatic methods were studied and optimized aiming at obtaining algae hydrolysates rich in carbohydrates.

From all the tested methods for cellular disruption of *Spyrogira* sp., the best results were obtained with enzymatic hydrolysis performed after a milling step. However, this is a lengthy and costly process. The high cost of enzymes stems from their production and from the fact that they usually cannot be recovered and recycled after being used. So it was decided to use acid hydrolysis by sulfuric acid 2 N in autoclave for 30 min in spite of the lower extraction yields (90 vs. 78 % extracted sugars).

Regarding bioethanol production, *Saccharomyces cerevisiae* is the most commonly used yeast in the fermentation process. However, this microorganism is not able to convert pentose sugars to ethanol. So a yeast screening towards the production of ethanol from microalgae hydrolysates was the final step of this work. *S. carlsbergensis*, showed to be the most promising microorganism among those tested presenting conversion yields of 82 % towards glucose and mannose. Besides, this yeast also presented the ability to use in some extent arabinose, a pentose found in algae hydrolysates.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
EXTENDED ABSTRACT	vi
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE QUADROS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
2.1. Fontes Renováveis de Energia – Biocombustíveis	3
2.1.1. Biocombustíveis de Primeira Geração	4
2.1.2. Biocombustíveis de Segunda Geração	5
2.1.3. Biocombustíveis de Terceira Geração – O Potencial das Algas	7
2.2. Microalga <i>Spirogyra</i> sp.....	12
2.3. Produção de Bioetanol a Partir de Microalgas.....	14
2.3.1. Cultura de Microalgas	14
2.3.1.1. Lagoas fotossintéticas	14
2.3.1.2. Fotobiorreactores fechados	15
2.3.2. Recuperação da Biomassa	18
2.3.3. Ruptura Celular e Sacarificação.....	19
2.4. Fermentação Alcoólica	20
2.4.1. Microrganismos Utilizados na Fermentação	21
2.4.2. Condições Óptimas do Processo Fermentativo	22
2.5. Produto Final – Bioetanol	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Microrganismos.....	26
3.1.1. Microalga.....	26
3.1.2. Leveduras.....	26
3.2. Enzimas.....	27

3.3. Meios de cultura	27
3.3.1. Microalga	27
3.3.2. Leveduras.....	28
3.4. Crescimento da Microalga <i>Spirogyra</i> sp.....	28
3.4.1. Produção de Biomassa Microalgal.....	28
3.4.2. Efeito do Regime de Luz no Crescimento de Culturas de <i>Spirogyra</i> sp.	30
3.5. Selecção do Método de Ruptura da Microalga.....	31
3.5.1. Moagem em Moinho Vibratório de Esferas	31
3.5.2. Homogeneização	32
3.5.3. Destruição por Microondas	32
3.5.4. Desintegração com Esferas de Vidro	33
3.5.5. Hidrólise Química em Autoclave.....	33
3.5.6. Hidrólise Enzimática da Alga Moída.....	33
3.6. Selecção de Leveduras para a Fermentação Alcoólica de Extracto de Microalga 34	
3.6.1. Crescimento de Inóculos	34
3.6.2. Fermentação Alcoólica em Meio Sintético	35
3.7. Metodologias Analíticas	36
3.7.1. Determinação da Biomassa Seca de Culturas de Microalga.....	36
3.7.2. Determinação da relação entre o valor da $DO_{640\text{ nm}}$ e a biomassa seca das culturas de levedura.....	36
3.7.3. Determinação do Teor em Aniões por Cromatografia Iónica	36
3.7.4. Hidrólise Ácida Quantitativa (HAQ).....	37
3.7.5. Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Redutores	37
3.7.6. Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Totais	38
3.7.7. Identificação e Quantificação de Açúcares e Seus Produtos de Degradação por HPLC	38
3.7.8. Avaliação do Teor em Etanol por Cromatografia Gasosa	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Crescimento da Microalga <i>Spirogyra</i> sp.....	40
4.1.1. Produção de Biomassa Microalgal.....	40
4.1.2. Características Morfológicas da Microalga <i>Spirogyra</i> sp.	43
4.1.3. Efeito do Regime de Luz no Crescimento de Culturas de <i>Spirogyra</i> sp.	45
4.1.4. Avaliação da Síntese de Açúcares pela Microalga <i>Spirogyra</i> sp.	51
4.2. Selecção do Método de Ruptura da Microalga.....	58
4.2.1. Métodos Físicos	58
4.2.2. Métodos Físico-Químicos	63

4.2.3. Métodos Físico-Enzimáticos	66
4.3. Selecção de Leveduras para a Fermentação Alcoólica de Extracto de Microalga	70
4.3.1. Crescimento de Inóculos	70
4.3.2. Fermentação Alcoólica em Meio Sintético	74
5. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO.....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Figura 1.1	Variação da concentração de CO ₂ na atmosfera e aumento global da temperatura no planeta. Fonte: Escobar <i>et al.</i> (2009).	2
-------------------	---	---

CAPÍTULO 2 – ENQUADRAMENTO TEÓRICO

Figura 2.1	Processos de conversão de energia a partir de biomassa e respectivos produtos finais. Fonte: Adaptado de Biocombustíveis (2011).	3
Figura 2.2	Ciclo fechado do carbono. Fonte: Adaptado de Escobar <i>et al.</i> (2009).	4
Figura 2.3	Estrutura da celulose (A) e da lenhina (B). Fonte: Wikipedia.	6
Figura 2.4	Representação da diversidade de algas. Fonte: Brodie e Lewis (2007).	7
Figura 2.5	Vias metabólicas em microalgas verdes relacionadas com a produção de biocombustíveis. Fonte: Beer <i>et al.</i> (2009).	10
Figura 2.6	Observação ao microscópio <i>DM LB</i> da <i>LEICA</i> numa ampliação x400, da espécie <i>Spirogyra</i> sp.	12
Figura 2.7	Reprodução sexuada na <i>Spirogyra</i> sp. A- 2 filamentos colocam-se lado a lado, B- Desenvolvem-se protuberâncias em cada filamento, C-O conteúdo da célula doadora (esq) migra através do tubo de conjugação para a célula receptora, D- O zigósporo dentro da célula receptora, E- O zigósporo liberta-se do filamento, F- Divisão meiótica, G- 3 dos 4 núcleos degeneram, H- O zigósporo forma filamento novo. Fonte: Adaptado de http://www.education.nic.in/cd50years/q/6j/BM/6JBM0101.htm e http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/2152/lb3pg5.htm .	13
Figura 2.8	Lagoas fotossintéticas do tipo <i>raceway ponds</i> . Fonte: Antunes e Silva (2010).	15

Figura 2.9	Fotobiorreactores do tipo <i>flat-plate</i> (A) em coluna (B), e do tipo tubular vertical (C). Fonte: Gouveia (2011).	16
Figura 2.10	Representação esquemática de uma levedura. Fonte: Adaptado de Prescott <i>et al.</i> (2002).	22
Figura 2.11	Evolução do consumo mundial de bioetanol (milhões de litros ano ⁻¹). Fonte: Adaptado de Biofuels Platform (2011).	24

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 3.1	Imagem dos fotobiorreactores tubulares de vidro (A) e dos fotobiorreactores em coluna (B) utilizados para produção de biomassa de <i>Spirogyra</i> sp.	29
Figura 3.2	Mangas de polietileno transparentes com capacidade para 20 L de meio de cultura utilizadas para crescimento da <i>Spirogyra</i> sp.	30
Figura 3.3	Moinho vibratório de esferas MM 400, Retsch (A) e pormenor do copo de moagem com 8 esferas de aço (B).	32
Figura 3.4	Homogeneizador DIAX 600, Heidolph.	32

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 4.1	Crescimento de uma cultura de <i>Spirogyra</i> sp. num reactor tubular de vidro. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.	40
Figura 4.2	Cultura da <i>Spirogyra</i> sp. filtrada para determinação da biomassa seca, onde são visíveis os aglomerados formados pela microalga.	41
Figura 4.3	Correlação entre a biomassa seca e DO _{540 nm} de uma cultura de <i>Spirogyra</i> sp. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.	42
Figura 4.4	Evolução do pH numa cultura de <i>Spirogyra</i> sp. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.	42

Figura 4.5	Movimento fototático da <i>Spirogyra</i> sp. (A) – movimento de deslize entre os filamentos, onde as setas indicam a direcção do movimento dos filamentos. (B) – Curvatura de filamentos em direcção à luz, onde as setas mostram a direcção da luz. Fonte: Kim <i>et al.</i> (2004).	43
Figura 4.6	Alterações fenotípicas observadas na cultura de <i>Spirogyra</i> sp. ao longo dos meses de ensaio. As imagens microscópicas apresentam ampliação x1000.	45
Figura 4.7	Imagem microscópica da cultura da microalga <i>Spirogyra</i> sp. contaminada por uma cianobactéria ao fim de 5 dias de cultura (ampliação x1000).	46
Figura 4.8	Crescimento de uma cultura de <i>Spirogyra</i> sp. em mangas de polietileno sob condições de iluminação artificial contínua (A) e com ciclo dia-noite (14h/10 h) (B). Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.	47
Figura 4.9	Evolução do pH na cultura de <i>Spirogyra</i> sp. mediante iluminação artificial contínua (A) e com ciclo dia-noite (14 h/10 h) (B). Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.	49
Figura 4.10	Evolução da concentração de sais no meio de cultura de <i>Spirogyra</i> sp. crescida sob condições de iluminação artificial contínua (A) e com ciclo dia-noite (14 h/10 h) (B): cloretos (◆), nitratos (□), fosfatos (▲) e sulfatos (○). Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado.	50
Figura 4.11	Técnicas utilizadas para a recuperação da biomassa de <i>Spirogyra</i> sp.: A – Centrifugação a 18 592 g e B – Filtração com rede para plâncton.	52
Figura 4.12	Evolução do teor em açúcares (○) e nitratos (◆) ao longo do tempo de desenvolvimento da cultura, sob condições de iluminação artificial contínua (A) e com ciclo dia-noite (14 h/10 h) (B). Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado.	53
Figura 4.13	Representação esquemática da degradação de açúcares em condições acídicas. Fonte Adaptado de Girisuta <i>et al.</i> (2006).	56

Figura 4.14	Cromatograma de HPLC da análise de uma amostra de hidrolisado de <i>Spirogyra</i> sp. em ácido sulfúrico 2 N numa coluna Aminex HPX-87H.	56
Figura 4.15	Evolução da concentração de ácidos de cadeia curta e produtos derivados da degradação de açúcares ao longo do tempo de cultura sob iluminação contínua (A) e ciclos dia-noite (B): (ác. fórmico (■), ác. levulínico (▲), ác. láctico (◇) e HMF (○)).	57
Figura 4.16	Extracção de açúcares de biomassa seca de <i>Spirogyra</i> sp. por ruptura celular com diferentes métodos físicos. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.	59
Figura 4.17	Efeito do tempo na extracção de açúcares de biomassa seca de <i>Spirogyra</i> sp., em moinho vibratório com 4 (◇) e 8 (○) esferas de aço de 8 mm. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.	60
Figura 4.18	Observação ao microscópio <i>DM LB</i> da Leica, numa ampliação x1000, de biomassa seca de <i>Spirogyra</i> sp. A – Células intactas sem sofrer tratamento, B – Células deterioradas após tratamento de 15 min com 8 esferas de aço.	60
Figura 4.19	Caracterização dos açúcares extraídos a partir de biomassa seca de <i>Spirogyra</i> sp. com diferentes métodos físicos (glucose (▣), dímeros de glucose (▤) e outros monossacáridos (■)).	61
Figura 4.20	Teor de produtos de degradação e ácidos de cadeia curta nos extractos de <i>Spirogyra</i> sp. por ruptura celular com diferentes métodos físicos (ác. acético – (■), ác. láctico (▤), ác. fórmico (▥), ác. propiónico (▦), furfural (▧) e HMF (▨)).	62
Figura 4.21	Composição em amido nos extractos de <i>Spirogyra</i> sp. após ruptura das células com moinho de esferas durante 5'; 8 esferas e com homogeneizador.	63
Figura 4.22	Extracção de açúcares a partir de biomassa seca de <i>Spirogyra</i> sp. com diferentes concentrações de ácido sulfúrico. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.	64

Figura 4.23	Caracterização dos açúcares extraídos a partir de biomassa seca de <i>Spirogyra</i> sp. com diferentes concentrações de ácido sulfúrico (glucose (■), dímeros de glucose (■) e outros monossacáridos (■)).	65
Figura 4.24	Teor de produtos de degradação e ácidos voláteis nos extractos de <i>Spirogyra</i> sp. em função da concentração de ácido sulfúrico usada na extracção (ác. acético – (■), ácido láctico (■), ácido fórmico (■), ácido propiónico (■), ácido levulínico (■) e HMF (■)).	66
Figura 4.25	Efeito da temperatura na extracção de açúcares de biomassa seca e moída de <i>Spirogyra</i> sp. com água - 70 °C (◇), 60 °C (▲) e 40 °C (●) - em 0,2 g de biomassa seca de <i>Spirogyra</i> sp.	68
Figura 4.26	Eficiência da hidrólise enzimática na extracção de açúcares a partir de 0,2 g (símbolos abertos) e 2 g (símbolos fechados) de biomassa moída de <i>Spirogyra</i> sp. – Hemicelulase (◆;◇), Viscozyme L (●; ○) e Carezyme 1000L (▲;△).	69
Figura 4.27	Curvas de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> DER 24 (A), <i>S. cerevisiae</i> COM 1890 (B), <i>S. carlsbergensis</i> ATCC 6269 (C), <i>K. thermotolerans</i> PYCC 2908 (D), <i>K. marxianus</i> PYCC 2671 (E), <i>T. delbrueckii</i> PYCC 4487 (F) e <i>P. stipitis</i> CBS 181 F (G) em meio MC com 50 gL ⁻¹ de glucose (incubação a T=30 °C e 150 rpm).	71
Figura 4.28	Relação entre a DO _{640 nm} e a biomassa seca das culturas de <i>T. delbrueckii</i> (◆), <i>K. thermotolerans</i> (■), <i>S. cerevisiae</i> COM 1890 (Δ), <i>S. cerevisiae</i> DER 24 (□), <i>S. carlsbergensis</i> (▲), <i>K. marxianus</i> (●) e <i>P. stipitis</i> (○) em meio MC com 50 gL ⁻¹ de glucose (incubação a T = 30 °C e 150 rpm).	73
Figura 4.29	Crescimento (A), produção de etanol (B) e consumo de açúcares (C) em culturas de <i>T. delbrueckii</i> em meio MC com 50 gL ⁻¹ de xilose (◇), glucose (■), galactose (▲), manose (○) e arabinose (□) (T = 30 °C; 150 rpm).	76
Figura 4.30	Crescimento (A), produção de etanol (B) e consumo de açúcares (C) em culturas de <i>S. carlsbergensis</i> em meio MC com 50 gL ⁻¹ de xilose (◇), glucose (■), galactose (□), manose (○) e arabinose (□) (T = 30 °C; 150 rpm).	77

ÍNDICE DE QUADROS

Página

CAPÍTULO 2 – ENQUADRAMENTO TEÓRICO

Quadro 2.1	Resumo das características dos principais grupos de algas eucariotas (Chl=clorofila). Fonte: Adaptado de Cano e Colomé (1986); Stanier <i>et al.</i> (1970).	8
Quadro 2.2	Composição em açúcares e proteínas de várias espécies de microalgas. Fonte: Harun <i>et al.</i> (2010c).	11
Quadro 2.3	Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de fotobiorreactores fechados. Fonte: Adaptado de Brennan e Owende (2010).	17
Quadro 2.4	Principais características dos métodos de recolha da biomassa. Fonte: Adaptado de Molina-Grima <i>et al.</i> (2003); Schenk <i>et al.</i> (2008).	18
Quadro 2.5	Tipos de pré-tratamento da biomassa e respectivas vantagens e desvantagens. Fonte: Adaptado de Molina-Grima <i>et al.</i> (2003); Choi <i>et al.</i> (2010); Harun <i>et al.</i> (2010b); John <i>et al.</i> (2011).	20
Quadro 2.6	Vantagens e desvantagens de vários microrganismos com vista à produção industrial de bioetanol. (GL – glucose; M – manose; GA – galactose; X – xilose; A – arabinose; EtOH – etanol). Fonte: Hahn-Hägerdal <i>et al.</i> (2007).	23
Quadro 2.7	Produtividade em etanol de diferentes matérias-primas. Fonte: Adaptado de Mussato <i>et al.</i> (2010).	25

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Quadro 3.1	Composição dos meios MR e YMA.	26
Quadro 3.2	Composição do meio Bold modificado para a <i>Spirogyra</i> sp. Fonte: UTEX (2011).	27
Quadro 3.3	Composição do meio MC.	28

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quadro 4.1	Concentração máxima de biomassa microalgal e produtividade para diferentes microalgas. Adaptado de Gouveia e Oliveira (2009).	41
Quadro 4.2	Valor médio das percentagens relativas obtidas para os açúcares quantificados por HPLC nos ensaios de crescimento de <i>Spirogyra</i> sp.	55
Quadro 4.3	Taxa específica de crescimento e concentração máxima de biomassa produzida para as leveduras estudadas em pré-culturas com 50 gL ⁻¹ de glucose (T = 30 °C; 150 rpm).	72
Quadro 4.4	Valores finais para fermentações em meio MC com 50 gL ⁻¹ de açúcar (GL – glucose; M – manose; GA – galactose; X – xilose; A – arabinose; EtOH – etanol).	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CHL - Clorofila

COVs – Compostos orgânicos voláteis

DNS - Ácido 3,5-dinitrossalicílico

DO_{540nm} - Densidade Óptica a 540 nm

DO_{640nm} - Densidade Óptica a 640 nm

EUA – Estados Unidos da América

FS – Fenol-Sulfúrico

GEE – Gases com efeito de estufa

I e D – Investigação e Desenvolvimento

NO_x – Óxidos de azoto

ppm – Partes por milhão (mg/kg)

SO_x – Óxidos de enxofre

UE – União Europeia

μ - taxa específica de crescimento

1. INTRODUÇÃO

Durante centenas de milhões de anos a biomassa morta de algas, plantas e animais foi sendo soterrada e a sua decomposição foi dando origem a depósitos de combustíveis fósseis - carvão, petróleo e gás natural. Estes combustíveis, pouca utilização tiveram por parte da sociedade humana até meados do século XVIII, com a revolução industrial, passando a desempenhar uma função essencial no desenvolvimento e no crescimento económico, uma vez que as exigências e necessidades humanas a nível de satisfação básica e de fornecimento de bens e serviços foram sendo cada vez maiores (Mayumi, 1991).

Como é sabido, a população mundial está a aumentar a uma velocidade alarmante, bem como a procura por fontes de energia. Actualmente, estes combustíveis representam 88 % do consumo total de energia - com o petróleo a liderar este ranking com uma quota de 35 %, o carvão 29 % e o gás natural 24 % - enquanto a energia nuclear e hidroelectricidade contam com 5 % e 7 % do consumo total de energia, respectivamente (Brennan e Owende, 2010). Além disso, as estimativas de 2007 relativamente ao petróleo, gás natural e carvão indicam a existência de reservas de 168 800 milhões de toneladas, 177 400 000 milhões de m³ e 847 500 milhões de toneladas, respectivamente. Estes dados mostram que se as tendências de consumo forem mantidas, as reservas mundiais de petróleo podem, potencialmente, esgotar-se até 2050 (Harun *et al.*, 2010b).

Associada a uma utilização não sustentável, está o facto da combustão destas fontes ser a principal fonte de emissão de gases com efeito de estufa (GEE) e de outros contaminantes, incluindo óxidos de enxofre (SO_x), monóxido de carbono (CO), compostos orgânicos voláteis (COVs) e partículas em suspensão (Hossain *et al.*, 2008; Patil *et al.*, 2008).

Na União Europeia (UE), os sectores de transporte e energético/industrial são as principais fontes antropogénicas responsáveis pela emissão de mais de 20 % e 60 % dos GEE, respectivamente. A agricultura é a terceira maior fonte, representando cerca de 9 % das emissões (Gouveia e Oliveira, 2009; Mata *et al.*, 2010). Um dos GEE mais abundante é o CO₂ e, desde os tempos pré-industriais as concentrações atmosféricas deste gás têm vindo a aumentar (Figura 1.1) (Escobar *et al.*, 2009). Segundo Schenk *et al.* (2008), níveis de CO₂ atmosférico acima de 450 ppm de CO₂ - equivalente (faixa perigosamente alta) já foram atingidos, tendo sido excedido este limite 10 anos mais cedo do que anteriormente tinha sido previsto.

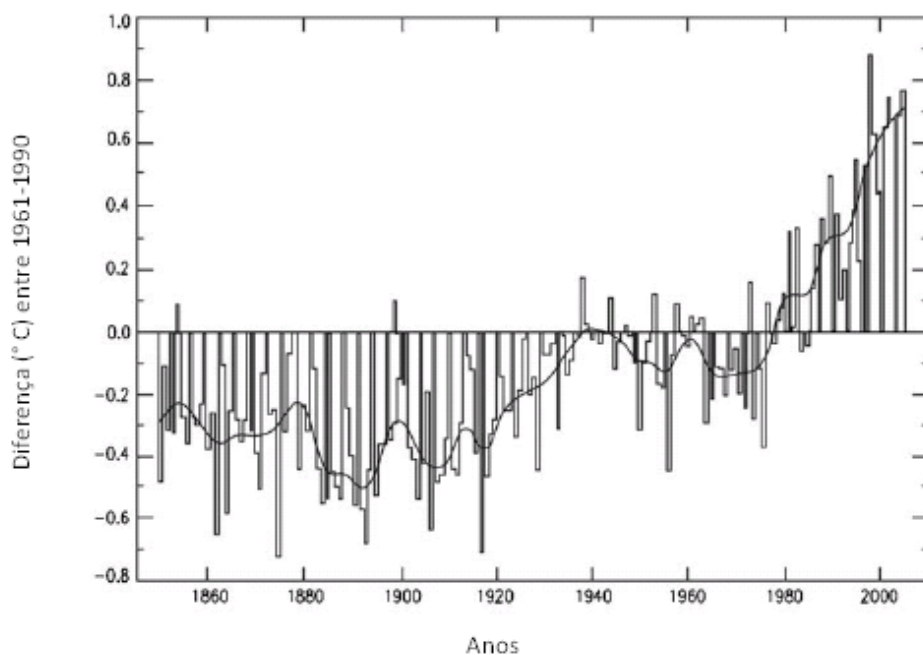


Figura 1.1 - Variação da concentração de CO₂ na atmosfera e aumento global da temperatura no planeta. Fonte: Escobar *et al.* (2009).

Tendo em conta estes dados, e sabendo que os recursos fósseis não são sustentáveis além de que são um grande contributo para o aumento do nível de CO₂ na atmosfera, é perceptível o porquê do aquecimento global que se vem observando ao longo dos últimos anos e as consequências graves que deste advêm, quer para o próprio ambiente – tendências irreversíveis na biodiversidade - quer para a vida humana – risco crescente de fome, inundações, escassez de água e doenças como a malária (Escobar *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2010).

A preocupação e a exigência desta situação, tem levado a um aumento da investigação por fontes de energia alternativas renováveis, eficientes, de baixo custo e capazes de contribuir para a sustentabilidade económica e ambiental (Chisti, 2007; John *et al.*, 2011), como é o caso da energia solar, da energia eólica e, claro, dos biocombustíveis. Têm ainda sido tomadas medidas incisivas, nomeadamente por parte da Comissão Europeia, que tenta promover a sustentabilidade ambiental, estabelecendo como objectivo a substituição em, pelo menos, 20 % dos combustíveis fósseis por combustíveis de origem renovável até 2020 (Directiva 2009/28/CE).

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. Fontes Renováveis de Energia – Biocombustíveis

A procura de recursos limpos que permitam assegurar as necessidades energéticas futuras constitui um dos maiores desafios da actualidade. A utilização de biomassa como fonte alternativa à energia primária de origem fóssil revelou-se uma excelente alternativa, pois pode permitir uma melhoria da qualidade de vida, particularmente em países sem reservas de combustíveis fósseis, como é o caso de Portugal, diminuindo a sua dependência económico-energética do exterior e reduzindo os impactos negativos resultantes da sua queima (Bioenergia, 2004; Hossain *et al.*, 2008). Os combustíveis obtidos a partir de biomassa designam-se por biocombustíveis, grupo onde está inserido um considerável número de diferentes produtos e formas de produção (Figura 2.1).

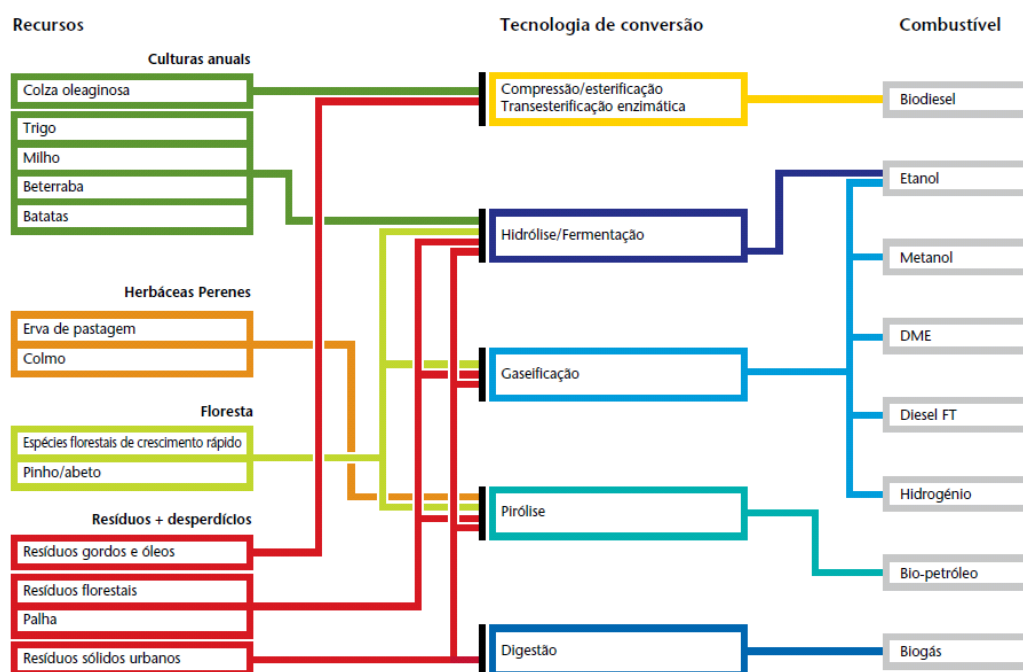


Figura 2.1 – Processos de conversão de energia a partir de biomassa e respectivos produtos finais. Fonte: Adaptado de Biocombustíveis (2011).

Os biocombustíveis permitem o desenvolvimento de novas oportunidades como diversificação das fontes de abastecimento de combustível, desenvolvimento da agricultura tradicional, melhoramento das condições económicas das populações do meio rural e redução da dependência energética dos combustíveis fósseis (Mata *et al.*, 2010).

Os principais biocombustíveis que podem substituir os tradicionais combustíveis diesel e gasolina nos veículos actuais sem que sejam necessárias alterações significativas na sua engenharia, são o biodiesel e o bioetanol, respectivamente (Mata *et al.*, 2010; Naik *et al.*, 2010). Um outro biocombustível que actualmente é visto como versátil e uma mais-valia para o futuro é o bio-hidrogénio que, pode ser utilizado como combustível num motor de combustão interna e trata-se do único combustível verdadeiramente livre de emissões de carbono, já que da sua oxidação resultam apenas moléculas de água (Kotay e Das, 2008).

Com base no tipo de matéria-prima utilizada e na tecnologia de conversão envolvida, os biocombustíveis são essencialmente classificados como biocombustíveis de primeira ou segunda geração (Escobar *et al.*, 2009; Naik *et al.*, 2010), embora alguns autores preconizem já uma terceira geração a partir de matérias-primas totalmente diferentes e que se encontram fora do Reino das Plantas (John *et al.*, 2011; Nigam e Singh, 2011).

2.1.1. Biocombustíveis de Primeira Geração

Os biocombustíveis de primeira geração - que dominam actualmente o mercado dos biocombustíveis com uma produção anual de 50 000 milhões de litros (Naik *et al.*, 2010) - são principalmente derivados de culturas alimentares ricas em sacarose (beterraba sacarina e cana-de-açúcar), amido (batata, milho e trigo) e/ou óleos vegetais (girassol, soja e colza), utilizando tecnologias simples e já implementadas industrialmente - hidrólise/fermentação e prensagem/esterificação (Biocombustíveis, 2011).

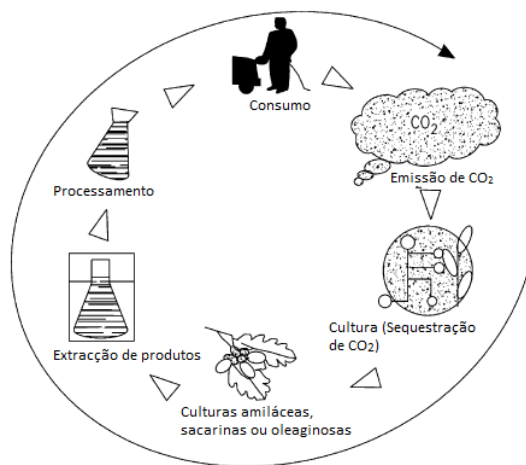


Figura 2.2 - Ciclo fechado do carbono. Fonte: Adaptado de Escobar *et al.* (2009).

As vantagens que estes combustíveis oferecem prendem-se com baixas emissões de CO₂ – em alguns casos o balanço pode ser zero se, as emissões de CO₂ globais corresponderem à quantidade sequestrada através da fotossíntese durante o crescimento da biomassa, resultando num ciclo fechado de carbono (Figura 2.2) - e,

com o facto de proporcionarem uma melhoria na segurança energética (Hossain *et al.*, 2008; Escobar *et al.*, 2009).

Todavia, às vantagens que caracterizam esta geração estão ligadas algumas preocupações. A preocupação mais comum é que à medida que aumenta a procura (e a capacidade de produção), aumenta a competição com a agricultura por terras aráveis para a plantação de culturas para fins alimentares. Esta pressão pode ter consequências ao nível do preço dos bens alimentares, da biodiversidade (Naik *et al.*, 2010) e, numa situação mais extrema, pode levar à escassez de alimentos, em especial nos países em desenvolvimento, onde já são mais de 800 milhões de pessoas a sofrer de fome e subnutrição (Schenk *et al.*, 2008).

As grandes quantidades de água que são necessárias e a sazonalidade das culturas são outros aspectos negativos. Estudos recentes mostraram ainda que as grandes quantidades de N₂O que entram na atmosfera são resultado da aplicação de fertilizantes azotados nas culturas. Esta situação contribui tanto ou mais para o aquecimento global que o CO₂ emitido pelos combustíveis fósseis, porque o N₂O tem 310 vezes o potencial de aquecimento global do CO₂ (Fernando *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). Além disso, a esta utilização pode estar associada a poluição dos terrenos agrícolas e das fontes de água, com consequências na segurança alimentar (Blottnitz e Curran, 2007; John *et al.*, 2011).

Para se tornarem uma alternativa viável, os biocombustíveis devem garantir ganho energético, benefícios ambientais (sequestro de CO₂ e redução de emissões), competitividade económica e potencial de produção em grandes quantidades, mas sem ameaçar a produção de bens alimentares (Hill *et al.*, 2006).

2.1.2. Biocombustíveis de Segunda Geração

A segunda geração de biocombustíveis difere da primeira, na medida em que propõe outras fontes de matéria-prima, nomeadamente biomassa que não é tradicionalmente usada na alimentação humana ou animal – resíduos lenhocelulósicos dos tipos vegetal e agro-industrial (Escobar *et al.*, 2009). Estes resíduos correspondem a mais de 50 % da biomassa produzida mundialmente, sendo por isso uma alternativa de baixo custo que, não concorrendo com a produção de alimentos, ainda tem o potencial de poder ser utilizada para a subsequente produção de biocombustíveis (Escobar *et al.*, 2009; John *et al.*, 2011), apresentando menor emissão de GEE e menor necessidade de pesticidas que a geração anterior (Hill *et al.*, 2009).

A biomassa lenhocelulósica apresenta na sua constituição celulose (40-50 %), hemicelulose (25-35 %) e lenhina (15-20 %) (Figura 2.3). A celulose é um homopolímero composto por moléculas de glucose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$ que tornam a estrutura compacta. A hemicelulose é um heteropolímero, cuja cadeia principal é constituída por moléculas de xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$ e as ramificações podem conter manose, arabinose, ramnose e galactose. Por fim, a lenhina diz respeito a uma associação de várias moléculas, nomeadamente, os álcoois coniferílico, cumarílico, e sinapílico. Este polímero pode encontrar-se covalentemente ligado à hemicelulose por ligações do tipo éster com ácido ferúlico (Gray *et al.*, 2006; Agbor *et al.*, 2011).

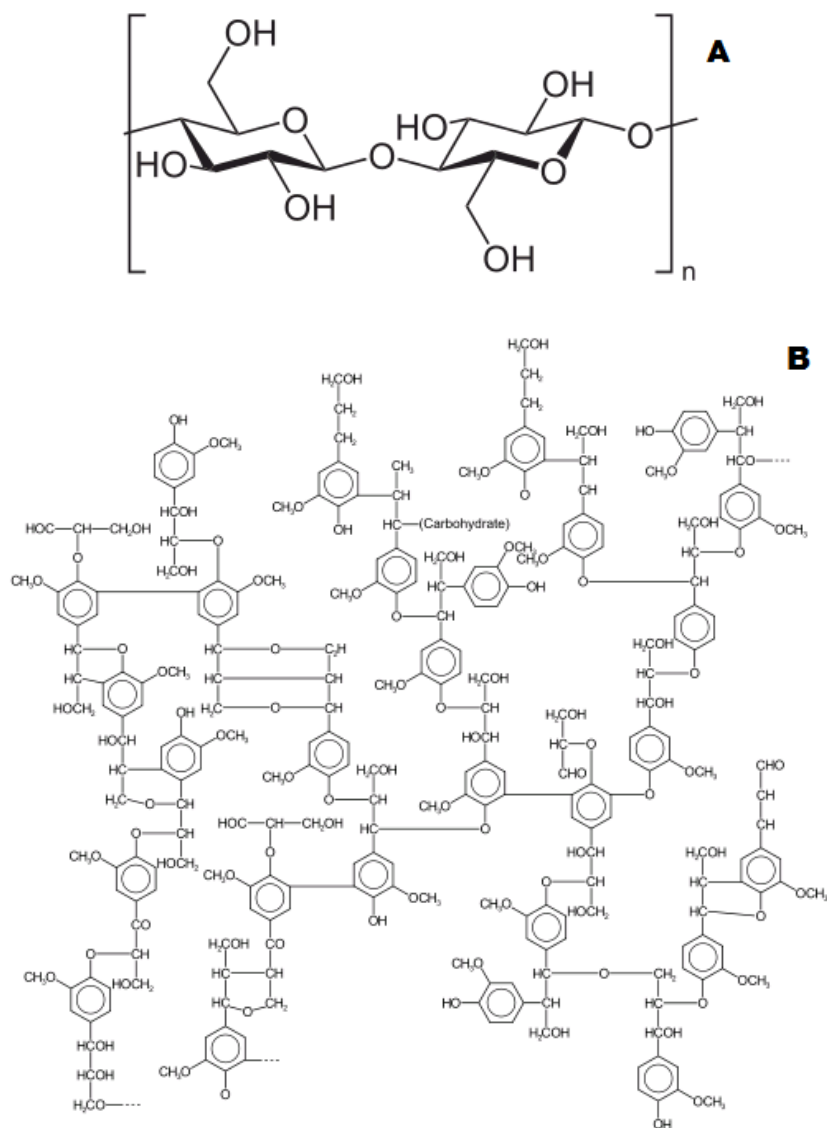


Figura 2.3 - Estrutura da celulose (A) e da lenhina (B). Fonte: Wikipedia.

A compactação e complexidade destas matérias fazem com que a disponibilidade dos açúcares fique comprometida e, por essa razão têm de ser submetidas a pré-tratamentos muito rigorosos e a tecnologias de hidrólise/fermentação, gaseificação ou pirólise. A maior parte destes processos, que para além de serem difíceis ainda não atingiram padronização mínima e características de tecnologias plenamente desenvolvidas, acarreta custos elevados, o que faz com que a sua produção ainda não esteja implementada em larga escala (Harun *et al.*, 2010b; Naik *et al.*, 2010).

2.1.3. Biocombustíveis de Terceira Geração – O Potencial das Algas

Na busca de alternativas para fornecer energia mais “verde” a custos suportáveis, um forte entusiasmo tem vindo a ser gerado em torno do potencial oferecido pelas algas como fonte energética.

As algas desempenham um papel essencial na biosfera, já que são as responsáveis pela produção da maior parte do oxigénio existente na atmosfera, para além de que são uma importante fonte de alimento para outros organismos aquáticos, podendo ainda ser utilizadas como suplementos alimentares e alimentos funcionais (Gouveia *et al.* 2008; Fradique *et al.* 2010).



Figura 2.4 - Representação da diversidade de algas. Fonte: Brodie e Lewis (2007).

São um grupo morfolologicamente diversificado de organismos fotossintéticos (Figura 2.4), com mais de 40 000 espécies identificadas e muitas outras por identificar (Hu *et al.*, 2008). Com base em características como motilidade, tipo de pigmentos fotossintéticos e natureza dos materiais de reserva produzidos, modo de reprodução e composição química da parede celular (se presente), as algas podem ser classificadas nas divisões sumarizadas no Quadro 2.1.

Quadro 2.1 – Resumo das características dos principais grupos de algas eucariotas. (Chl=clorofila). Fonte: Adaptado de Stanier *et al.* (1970); Cano e Colomé (1986).

Divisão	Pigmentos	Nº e tipo de flagelo	Natureza dos materiais de reserva	Composição da parede celular
<i>Chlorophyta</i> (algas verdes)	Chl <u>a</u> e <u>b</u> ; <u>α</u> , <u>β</u> e <u>γ</u> carotenos; xantofilas	Geralmente 2 idênticos por célula	Amido	Celulose
<i>Phaeophyta</i> (algas castanhas)	Chl <u>a</u> e <u>c</u> ; <u>α</u> e <u>β</u> carotenos; xantofilas e fucoxantinas	2 de tamanhos distintos	Laminarina, manitol e gorduras	Celulose e alginato
<i>Rhodophyta</i> (algas vermelhas)	Chl <u>a</u> ; <u>α</u> e <u>β</u> carotenos; ficocianinas, ficoeritrinas e xantofilas	-	Amido	Celulose e xilanas
<i>Chrysophyta</i> (diatomáceas)	Chl <u>a</u> e <u>c</u> ; <u>β</u> caroteno; xantinas e fucoxantinas	2 de arranjo variável	Leucosina e óleos	Celulose, sílica e carbonato de cálcio
<i>Pyrrophyta</i> (dinoflagelados)	Chl <u>a</u> e <u>c</u> ; <u>β</u> caroteno; xantofilas	2 diferentes na forma e posição na célula	Amido e óleos	Celulose
<i>Euglenophyta</i> (euglenóides)	Chl <u>a</u> e <u>b</u> ; <u>β</u> caroteno; xantofilas	1 a 3 por célula	Paramilo e gorduras	-

Alguns autores defendem, contudo, a inserção de mais divisões, nomeadamente da divisão *Cyanochloronta*, onde estão contidas as cianobactérias. O termo “algas” engloba assim uma grande variedade de organismos – as microalgas (organismos

unicelulares eucariotas produto de 3 000 milhões de anos de evolução), as macroalgas (que representam o extenso grupo de organismos marinhos) e as cianobactérias (organismos procariotas também designados por algas azuis) (Cano e Colomé, 1986; Rosenberg *et al.*, 2008; Sialve *et al.*, 2009; Ferrel e Sarisky-Reed, 2010).

A grande maioria das microalgas apresenta um metabolismo autotrófico fotossintético que se caracteriza pela sua capacidade de sintetizar matéria orgânica de reserva a partir de carbono inorgânico (nomeadamente CO₂ atmosférico), através do processo de fotossíntese (Richmond, 2004; Tsukahara e Sawayama, 2005; Eshaq *et al.*, 2010). Muitas outras espécies apresentam outros tipos de metabolismo, nomeadamente as microalgas heterotróficas que utilizam somente carbono orgânico como fonte de carbono e de energia e, as mixotróficas capazes de viver de modo autotrófico ou heterotrófico, dependendo da concentração de compostos orgânicos e da intensidade de luz disponível, podendo também ser designadas por autotróficas facultativas (Ferreira e Sousa, 1998).

Não obstante, não é apenas a fonte de carbono (orgânica ou inorgânica), os nutrientes (azoto, fósforo, potássio), as vitaminas e os minerais fornecidos pelo meio de cultura, que são vitais para o crescimento das algas. O equilíbrio entre os parâmetros operacionais (temperatura, intensidade luminosa e regime, oxigénio dissolvido, homogeneização, pH e CO₂) é também de extrema importância.

O conceito de utilização de algas como matéria-prima energética remonta ao final dos anos 50, mas o esforço concertado começou com a crise do petróleo na década de 70. Actualmente sabe-se que as microalgas apresentam diversas características que lhes permitem tornar-se uma alternativa auspiciosa para a produção de biocombustíveis (Chisti, 2007; Dismukes *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Beer *et al.*, 2009; Lardon *et al.*, 2009; Eshaq *et al.*, 2010; Harun *et al.*, 2010a; Pittman *et al.*, 2011):

- Maiores taxas de fixação de CO₂ e de produção de O₂;
- O mecanismo fotossintético é em tudo semelhante ao das plantas, contudo, devido à estrutura simples e ao facto de se encontrarem submersas num ambiente aquático onde têm um acesso fácil a água, CO₂ e outros nutrientes, as microalgas são mais eficientes (3-8 % face a 0,5 %) na conversão de energia solar em biomassa, o que também é favorecido pela ausência de estruturas de suporte;

- Possibilidade de cultivo em climas variados e terrenos não aráveis, incluindo áreas marginais inadequadas para fins agrícolas, por exemplo, desertos e praias, eliminando a competição por áreas correntemente utilizadas para a agricultura e produção de bens alimentares;
- Versatilidade em relação à utilização de água, podendo ser cultivadas em água doce ou salgada e também em efluentes e águas residuais impróprias para o consumo humano;
- Possibilidade das suas vias biossintéticas serem manipuladas e direccionadas, através da alteração das condições de cultivo e de *stress* ambiental, para a produção e acumulação substancial dos compostos desejáveis para a produção dos biocombustíveis;
- Evitam impactos ambientais, como a desertificação do solo e desflorestação;
- Não necessitam de pesticidas ou herbicidas e não produzem contaminantes.

Ademais, a perspectiva de melhoria através de engenharia genética, pode proporcionar maior viabilidade económica (Harun *et al.*, 2010b).

As microalgas, além do potencial de fornecer substrato para diferentes tipos de biocombustíveis (Figura 2.5) podem, na sequência do que foi acima mencionado, servir outros propósitos: biofixação de CO₂ derivado do funcionamento de instalações industriais (contribuindo para a redução das emissões de GEE); tratamento de águas residuais através da remoção de nutrientes (por exemplo, nitratos e fosfatos) necessários ao seu crescimento, levando a redução de custos e minimização da eutrofização; aproveitamento da biomassa residual para alimentação animal, como fertilizantes orgânicos; geração de electricidade através da incineração (Wang *et al.*, 2008); ou para a recuperação de compostos com valor

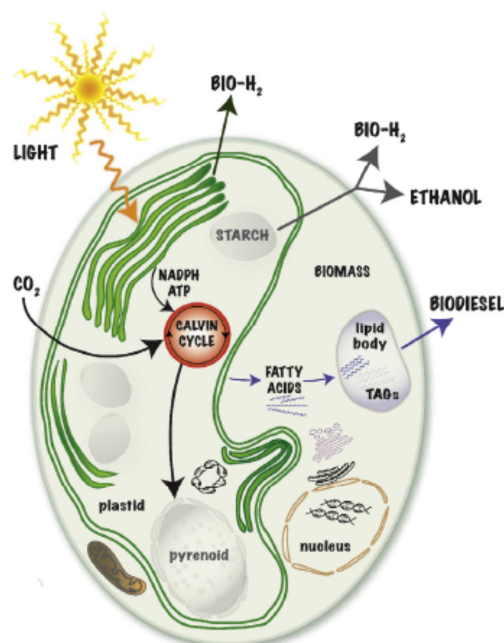


Figura 2.5 – Vias metabólicas em microalgas verdes relacionadas com a produção de biocombustíveis. Fonte: Beer *et al.* (2009).

comercial tais como pigmentos, antioxidantes, polissacáridos e certos compostos bioactivos com aplicações nas áreas de nutrição, farmacêutica e cosmética (Olaizola, 2003; Raja *et al.*, 2008; Harun *et al.*, 2010c).

Para que o rendimento destas aplicações não seja afectado, deverá ser feita uma escolha prévia do tipo e espécie de microalga mais apropriada para o efeito que se pretende (Ferrel e Sarisky-Reed, 2010).

Por exemplo, para a produção de bioetanol, microalgas como a *Spirogyra* sp., *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Prymnesium* e *Porphyridium* são conhecidas por acumularem grandes teores de amido e glicogénio (> 50 % da biomassa seca) no seu interior (Eshaq *et al.*, 2010), como se pode averiguar no Quadro 2.2.

Quadro 2.2 – Composição em açúcares e proteínas de várias espécies de microalgas. Fonte: Harun *et al.* (2010c).

Espécies de algas	Açúcares (% biomassa seca)	Proteínas (% biomassa seca)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10 - 17	50 – 56
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	-	47
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21 – 52	8 – 18
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17	48
<i>Chlorella vulgaris</i>	12 – 17	51- 58
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26	57
<i>Spirogyra</i> sp.	33 – 64	6 – 20
<i>Dunaliella bioculata</i>	4	49
<i>Dunaliella salina</i>	32	57
<i>Euglena gracilis</i>	14 – 18	39 – 61
<i>Prymnesium parvum</i>	25 – 33	28 – 45
<i>Tetraselmis maculata</i>	15	52
<i>Porphyridium purpureum</i>	40 – 57	28 – 39
<i>Spirulina platensis</i>	8 – 14	46 – 63
<i>Spirulina máxima</i>	13 – 16	60 – 71
<i>Synechococcus</i> sp.	15	63
<i>Anabaena cylindrica</i>	25 – 30	43 – 56

Neste trabalho, a escolha recaiu sobre a microalga *Spirogyra* sp. com o intuito de atingir um rendimento óptimo de bioetanol, pois esta alga é descrita como portadora de elevados teores de açúcares, como se pode constatar pelo Quadro 2.2.

Existem contudo alguns factores que podem ainda influenciar a produtividade das microalgas. A eficiência da fotossíntese é um dos aspectos determinantes, afectando a taxa de crescimento, a produção de biomassa e, potencialmente, o percentual de biomassa precursor do combustível desejado (Ferrel e Sarisky-Reed, 2010). A baixa concentração de biomassa na cultura, devido ao limite de penetração da luz, em combinação com o pequeno tamanho das células faz com que a recolha da biomassa seja um processo relativamente moroso e caro. Os custos elevados e os cuidados intensivos que são requeridos para a produção de microalgas, relativamente às culturas terrestres, podem ser factores que retardam a implementação comercial de biocombustíveis a partir desta fonte (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008).

2.2. Microalga *Spirogyra* sp.

A microalga *Spirogyra* sp. pertence à divisão *Chlorophyta* (algas verdes) e à família *Zygnemaceae* onde estão inseridas as algas filamentosas não ramificadas (Hainz *et al.*, 2009). As suas células são cilíndricas e de dimensões que rondam 1 a 10 µm de largura e em comprimento pode estender-se até vários centímetros (Jordan, 1970; Lee e Chang, 2011).

A parede celular apresenta duas camadas - a mais interna é composta por pectina e a externa é de natureza celulósica. A pectina é um polissacárido constituído principalmente por uma cadeia linear de moléculas de ácido galacturónico, frequentemente esterificadas com um grupo metilo, e unidas por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1-4)$. Intercaladas com as moléculas de ácido galacturónico, existem moléculas de ramnose, onde ocorrem ramificações com outros açúcares neutros, nomeadamente arabinose ou galactose (Dongowski *et al.*, 2000).

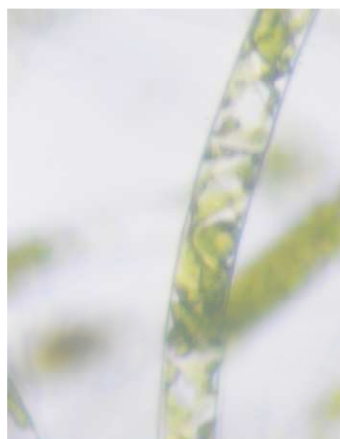


Figura 2.6 - Observação ao microscópio *DM LB* da *Leica*, numa ampliação x400, da espécie *Spirogyra* sp.

No interior da célula observam-se algumas particularidades, nomeadamente cloroplastos enrolados em espiral (Figura 2.6), propriedade única deste género que, para além de proporcionar um fácil reconhecimento, é o responsável pelo

seu nome. São ainda visíveis os pirenóides, corpos pequenos e redondos no cloroplasto, onde ocorre a produção de amido (Parmentier, 1999).

A *Spirogyra* sp. apresenta dois modos de reprodução distintos. A reprodução vegetativa (assexuada) ocorre devido a fragmentação, isto é, pode ocorrer lesão mecânica do filamento ou dissolução da lamela média e este dá origem a pequenos fragmentos que, por sua vez, se transformam em filamentos novos por divisão celular. A reprodução sexuada (Figura 2.7) ocorre por conjugação entre uma célula feminina (que recebe o gâmeta) e uma masculina (que doa) e, da fusão dos gâmetas resulta um zigósporo que permanece no interior da célula feminina até à sua morte, altura em que é libertado. Em condições favoráveis o zigósporo divide-se por meiose produzindo quatro núcleos haplóides, dos quais três degeneram e apenas um continua funcional. Durante a germinação rompem-se as paredes do zigósporo e surge um pequeno fragmento que, por repetidas divisões mitóticas se torna num filamento novo (Mahendra, 2008).

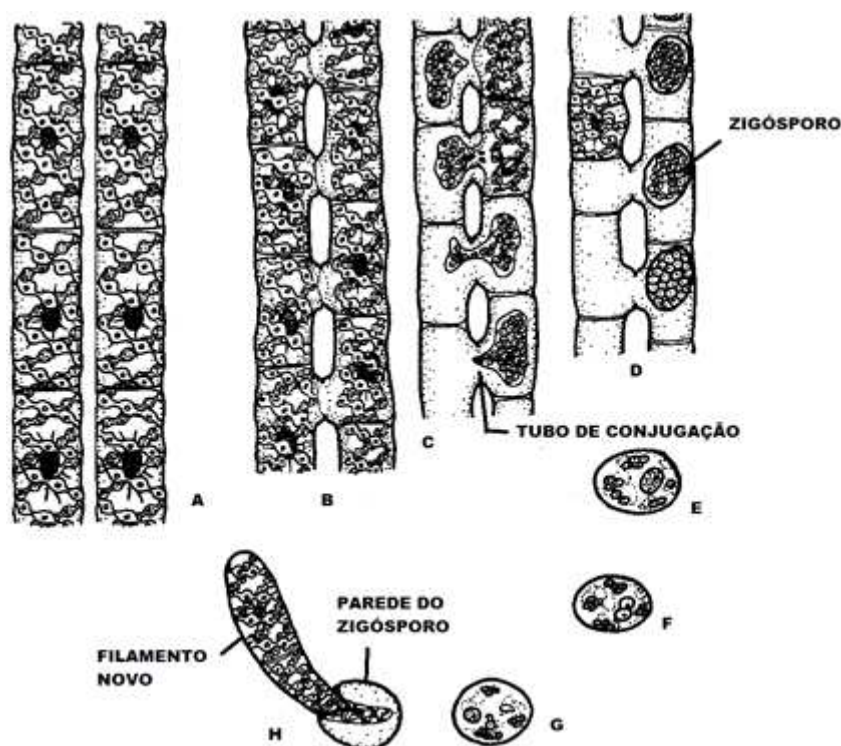


Figura 2.7 - Reprodução sexuada na *Spirogyra* sp. A- 2 filamentos colocam-se lado a lado, B- Desenvolvem-se protuberâncias em cada filamento, C- O conteúdo da célula doadora (esq) migra através do tubo de conjugação para a célula receptora, D- O zigósporo dentro da célula receptora, E- O zigósporo liberta-se do filamento, F- Divisão meiótica, G- 3 dos 4 núcleos degeneram, H- O zigósporo forma filamento novo. Fonte: Adaptado de <http://www.education.nic.in/cd50years/q/6j/BM/6JBM0101.htm> e <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/2152/lb3pg5.htm>.

Esta espécie pode ser encontrada numa vasta gama de *habitats*, incluindo pequenos corpos de água estagnada, valas, bem como em águas calmas de lagoas, canais, rios e lagos, onde forma muitas vezes grandes volumes de massa verde na sua superfície (Wang *et al.*, 1989; Mahendra, 2008).

Para além da sua capacidade de acumulação de açúcares, que poderão ser utilizados como substrato para a produção de bioetanol, estudos relatam que a microalga *Spirogyra* sp. tem ainda uma grande capacidade de ligação com metais, devido à presença de polissacáridos e proteínas na superfície da parede celular, onde grupos hidroxilo, amino, carboxilo e alquilo, marcam presença e funcionam como locais de adsorção dos metais (Lee e Chang, 2011).

2.3. Produção de Bioetanol a Partir de Microalgas

A produção de bioetanol a partir das microalgas é um processo extenso que envolve as etapas de crescimento dos organismos, recolha (para constituir uma reserva de biomassa), ruptura celular (para quebra das paredes celulares e libertação dos polissacáridos), sacarificação (para transformação dos polissacáridos em açúcares fermentescíveis), fermentação e recuperação do produto final (Antunes e Silva, 2010; Harun e Danquah, 2011a).

2.3.1. Cultura de Microalgas

A produção de etanol a partir de microalgas requer grandes quantidades de biomassa. Para que tal seja possível, têm sido desenvolvidas diversas metodologias para o seu cultivo. Os dois sistemas mais comuns são as lagoas fotossintéticas e os fotobiorreactores fechados (Borowitzka, 1999; Carvalho *et al.*, 2006; Patil *et al.*, 2008).

2.3.1.1. Lagoas fotossintéticas

As lagoas fotossintéticas são utilizadas para o cultivo de microalgas desde os anos 50, pelo que os conhecimentos inerentes a esta tecnologia estão já bem consolidados. As lagoas mais utilizadas em processos industriais são do tipo *raceway ponds* (Figura 2.8), geralmente constituídas por canais de recirculação independentes, os quais formam um *loop* fechado, de modo a que a difusão do CO₂ captado da atmosfera e a penetração da luz solar seja possível. Faz ainda parte da sua constituição um braço

rotativo com pás, responsável pela mistura e circulação necessárias para evitar a sedimentação e proporcionar o crescimento das microalgas e o aumento da produtividade (Borowitzka, 1999; Carvalho *et al.*, 2006; Brennan e Owende, 2010).

Este sistema de produção de biomassa em larga escala apresenta vantagens relacionadas com o baixo custo de construção e manutenção (Harun *et al.*, 2010c), utilização de terras com potencial marginal para a agricultura, necessidade reduzida de energia e fácil manutenção (Brennan e Owende, 2010).



Figura 2.8 – Lagoas fotossintéticas do tipo *raceway ponds*. Fonte: Antunes e Silva (2010).

Os principais constrangimentos relacionados com a operação de sistemas abertos como este, são o facto de estarem sujeitos a flutuações diárias e sazonais da temperatura, o custo associado à colheita - já que há um grande volume de água a tratar - e, as perdas para a atmosfera por evaporação tornam também a utilização do CO₂ menos eficiente, o que conduz a uma produtividade inferior à teoricamente possível (Borowitzka, 1999; Carvalho *et al.*, 2006;). Adicionalmente, a impossibilidade de controlar a contaminação por fungos, bactérias, protozoários e inclusive por outras algas, afecta também a eficiência da produção de biomassa (Patil *et al.*, 2008).

Os sistemas abertos podem ser usados para espécies de microalgas de crescimento muito rápido ou para espécies que crescem em condições extremas, tais como salinidade elevada (*Dunaliella*), pH elevado (*Spirulina*) ou mesmo meios nutricionalmente muito ricos (*Chlorella*) (Harun *et al.*, 2010c).

2.3.1.2. Fotobiorreactores fechados

A produção de microalgas com base em fotobiorreactores fechados foi desenvolvida com o intuito de superar alguns dos principais problemas associados aos sistemas

abertos. Os fotobiorreactores podem impedir ou, pelo menos minimizar a contaminação, facilitar o cultivo de diversas espécies de microalgas, oferecer maior controlo sobre uma série de outras condições de crescimento, tais como pH, luz e temperatura e, reduzir as perdas de água por evaporação e perdas de CO₂, o que se reflecte numa concentração celular mais elevada (Borowitzka, 1999; Carvalho *et al.*, 2006; Brennan e Owende, 2010). O alto custo de instalação e operação é geralmente o que impede estes sistemas de serem competitivos (Carvalho *et al.*, 2006).

Novos *designs* têm sido desenvolvidos nos últimos anos e os mais comuns (Figura 2.9) incluem fotobiorreactores do tipo tubular - verticais, horizontais, inclinados ou em hélice – *flat-plate* e em coluna, também designados por fotobiorreactores do tipo fermentador. O princípio fundamental é comum a todos eles - o aumento da área superficial exposta à iluminação (Carvalho *et al.*, 2006). As vantagens e desvantagens de cada sistema encontram-se sumarizadas no Quadro 2.3.

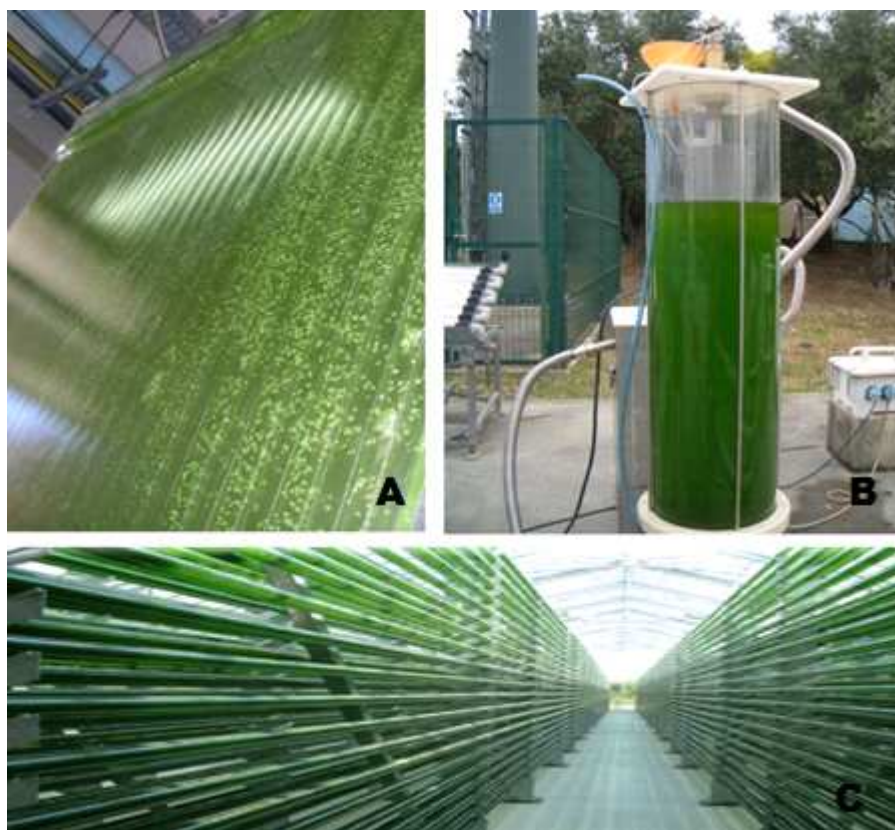


Figura 2.9 – Fotobiorreactores do tipo *flat-plate* (A), em coluna (B) e do tipo tubular vertical (C).
Fonte: Gouveia (2011).

Quadro 2.3 – Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de fotobiorreactores fechados.

Fonte: Adaptado de Brennan e Owende (2010).

Tipo de fotobiorreactor	Vantagens	Desvantagens
Tubular	Grande superfície de iluminação	Possibilidade de crescimento de algas nas paredes do reactor e de incrustações
	Adequado para culturas no exterior	Formação de gradientes de pH, de oxigénio dissolvido e de CO ₂ ao longo dos tubos
	Relativamente barato	
	Boa produtividade de biomassa	Requer grandes áreas
Flat-plate	Alta produtividade de biomassa	Controlo de temperatura e <i>scale-up</i> difíceis
	Fácil de desinfectar	Baixo nível de <i>stress</i> hidrodinâmico
	Reduzida acumulação de oxigénio	Possibilidade de crescimento de algas nas paredes do reactor
	Grande área de iluminação e boas condições	
	Adequado para culturas no exterior	
Coluna	Compacto	Reduzida área de iluminação
	Elevada transferência de massa	
	Baixo consumo de energia	Dispendioso relativamente aos sistemas abertos
	Turbulência elevada	
	Boa homogeneização	Construção, em geral, sofisticada
	Fácil de desinfectar	
	Baixa foto-inibição e foto-oxidação	

Segundo Chisti (2008), diferentes tipos de fotobiorreactores têm sido desenvolvidos, mas os tubulares parecem ser os mais apropriados para a produção de biomassa microalgal à escala necessária na produção de biocombustíveis.

2.3.2. Recuperação da Biomassa

A recolha da biomassa do meio de cultura é uma das etapas mais problemáticas. Por um lado, devido ao reduzido tamanho das células e, por outro, devido ao grande teor de água envolvido, que deve ser removido para que as etapas seguintes sejam exequíveis. Esta etapa apresenta um custo que pode rondar os 20 a 30 % de todo o custo de produção (Molina-Grima *et al.*, 2003) e, envolve muitas vezes, a aplicação de mais do que uma técnica. As mais comuns são a sedimentação, a centrifugação, a floculação e a filtração (Quadro 2.4). A selecção está dependente das características das microalgas, como a densidade, o tamanho e também do valor do produto final (Olaizola, 2003; Brennan e Owende, 2010).

Quadro 2.4 – Principais características dos métodos de recolha da biomassa. Fonte: Adaptado de Molina-Grima *et al.* (2003) e Schenk *et al.* (2008).

Método	Características relevantes	Vantagens	Desvantagens
Filtração	Pode funcionar sob pressão ou vácuo.	Factor de concentração elevado	Limitado a microalgas coloniais ou filamentosas. Possível colmatção. Processo moroso.
Centrifugação	A recuperação depende das características de sedimentação das células, do tempo de permanência na centrífuga, da temperatura e da profundidade de decantação.	Para a maioria das microalgas é eficaz. A biomassa fica bastante concentrada.	Processo moroso e não é energeticamente eficiente, o que se reflecte no aumento dos custos.

Continuação do Quadro 2.4

Método	Características relevantes	Vantagens	Desvantagens
Floculação	A adição de agentes químicos induz a agregação das células das microalgas por neutralização, inversão das cargas eléctricas das paredes celulares ou por formação de ligações entre as microalgas.	A floculação proporciona o aumento do tamanho das partículas, o que torna a sedimentação mais rápida.	O processo pode ser moroso e carece de muito espaço. A utilização de floculantes pode tornar o processo dispendioso à escala industrial. Possível alteração do produto final.
Sedimentação	A concentração da biomassa ocorre pelo simples assentamento das células	Processo simples e de custos reduzidos. Ausência de agentes químicos.	Processo lento e produto final com elevado teor de água. Em ambientes de temperatura elevada a biomassa pode ficar deteriorada.

Qualquer que seja a técnica de colheita escolhida deve verificar-se uma elevada relação custo/eficiência.

2.3.3. Ruptura Celular e Sacarificação

Com o processo de ruptura celular são libertados compostos intracelulares, como proteínas, lípidos, polissacáridos, ácidos nucleicos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular e iões.

No caso das microalgas, a ruptura das células para recuperação de açúcares é usualmente executada por três modos distintos: fisicamente (moagem, desintegração com esferas de vidro e homogeneização), quimicamente (tratamentos com ácidos ou com bases associados a altas temperaturas e/ou pressões) e biologicamente utilizando combinações de enzimas. As principais vantagens e desvantagens de cada pré-tratamento encontram-se sumarizadas no Quadro 2.5.

Quadro 2.5 – Tipos de pré-tratamento da biomassa e respectivas vantagens e desvantagens.

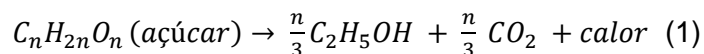
Fonte: Adaptado de Molina-Grima *et al.* (2003); Choi *et al.* (2010); Harun *et al.* (2010b); John *et al.* (2011).

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Físico	Não há produtos químicos tóxicos envolvidos.	Consumo de energia elevado e hidrólise insuficiente.
Químico	Rapidez e eficiência da hidrólise.	Custos elevados. Se for utilizado ácido concentrado pode ocorrer corrosão do equipamento e formação de substâncias tóxicas. Em condições ácidas pode ainda ocorrer decomposição dos monossacáridos em componentes indesejáveis que inibem a fermentação.
Biológico	Selectividade, menor quantidade de resíduos, pode ser desenvolvido a temperaturas relativamente baixas e possibilita o uso de equipamento simples.	Necessita de pré-tratamento prévio, processo moroso e custo elevado de algumas hidrolases.

Uma vez extraídos os açúcares, estes são hidrolisados dando origem a açúcares mais simples - as pentoses (compostas por 5 carbonos) e as hexoses (compostas por 6 carbonos) provenientes da hidrólise da hemicelulose, da celulose e também do amido ou outros polissacáridos presentes no interior da microalga – que podem ser explorados como substrato para o processo de fermentação (Harun *et al.*, 2011).

2.4. Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico que provoca a transformação do açúcar em etanol e CO₂ na presença de microrganismos, de acordo com a equação 1 (Escobar *et al.*, 2009).



No caso das algas, o etanol pode ser produzido por via directa usando certos géneros de algas (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Microcystis*) que têm capacidade de realizar fermentação directa no escuro. Nesta situação, a produção de etanol ocorre em condições de anaerobiose através do consumo dos açúcares armazenados intracelularmente (Ueda *et al.*, 1996; John *et al.*, 2011).

O processo implica gastos reduzidos de energia, pois não requer o processamento prévio da biomassa, mas até agora os resultados publicados não foram muito prometedores - 1 e 2,07 % (m.m⁻¹) e foram obtidos por Hirano *et al.* (1997) com a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* e Ueno *et al.* (1998) com *Chlorococum littorale*, respectivamente – e, por isso, este não será um processo particularmente interessante para a escala industrial.

O processo industrial tradicionalmente usado para a produção de etanol poderá, contudo, ser aplicado a culturas de microalgas desde que seja realizado um pré-tratamento de hidrólise, tal como os referidos no ponto anterior.

2.4.1. Microrganismos Utilizados na Fermentação

Bactérias, leveduras ou fungos filamentosos são os microrganismos que podem ser utilizados na fermentação de açúcares para a produção de etanol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Neste trabalho foram escolhidas as leveduras (Figura 2.10), que constituem um grupo de microrganismos eucariotas (integrado no Reino *Fungi* e no domínio *Eukarya*) quimiorgano-heterotróficos que utilizam açúcares disponíveis na natureza como fonte de energia com elevada eficiência. São caracterizadas por um crescimento vegetativo predominantemente unicelular e pela possibilidade de reprodução por dois modos distintos: assexuadamente - gemulação é a mais frequente – e de forma sexuada pela formação de esporos (Prescott *et al.*, 2002).

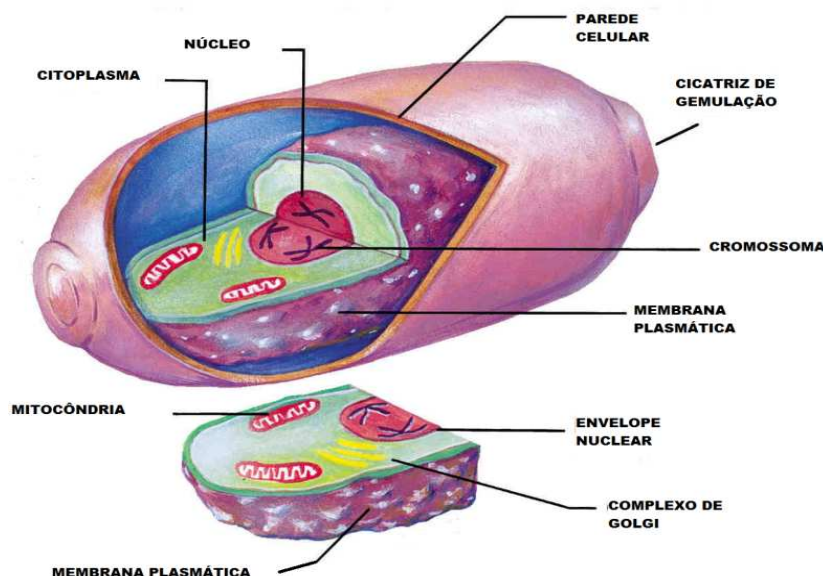


Figura 2.10 - Representação esquemática de uma levedura. Fonte: Adaptado de Prescott *et al.* (2002).

2.4.2. Condições Ótimas do Processo Fermentativo

As leveduras são altamente tolerantes às variações do pH do meio, podendo crescer em meios onde o pH se encontre entre 2,5 e 8,5. Contudo, o pH ideal para um desempenho eficiente no processo fermentativo é entre 4-5 (Quadro 2.6). A sua preferência por pH baixo proporciona uma importante vantagem sobre as bactérias (Rehm e Reed, 1981).

A temperatura ideal para o metabolismo das leveduras durante a fermentação encontra-se entre 28 e 34 °C. Temperaturas superiores inibem o crescimento celular, especialmente na presença de elevados teores de etanol (Brown e Oliver, 1982).

Um outro factor que pode interferir no processo fermentativo é a fonte de carbono (açúcar). Tendo em conta a constituição da parede celular da *Spirogyra* sp., no hidrolisado de microalga poderão estar presentes dois tipos de açúcares - pentoses e hexoses - que podem ser fermentados a etanol. Posto isto, o microrganismo ideal para a produção de etanol seria o que tivesse capacidade de utilizar ambos. O microrganismo mais utilizado em fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta cerca de 90 % de capacidade de transformação de glucose a etanol (Sulfahri *et al.*, 2011). Contudo, este microrganismo não é promissor na fermentação de pentoses e, microrganismos que apresentem capacidade de fermentar

estes açúcares ou mesmo pentoses e hexoses em simultâneo são limitados, sobretudo a nível das leveduras (Quadro 2.6).

Quadro 2.6 – Vantagens e desvantagens de vários microrganismos com vista à produção industrial de bioetanol (GL – glucose; M – manose; GA – galactose; X – xilose; A – arabinose; EtOH - etanol). Fonte: Adaptado de Hahn-Hägerdal *et al.*, (2007).

Organismo	Açúcares utilizados					Produtos maioritários		Tolerância		O ₂	pH
	GL	M	GA	X	A	EtOH	Outros	Álcoois	Ácidos		
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	-	-	+	-	++	++	-	Ácido
<i>P. stipitis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Ácido
Fungos filamentosos	+	+	+	+	+	+	-	++	++	-	Ácido
Bactérias anaeróbias	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Neutro

Da hidrólise ácida pode resultar ainda a formação de alguns subprodutos que interferem negativamente no processo de fermentação, tais como ácidos alifáticos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) e furaldeídos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) (Chandel *et al.*, 2007). Concomitantemente, para melhorar a performance da fermentação e reduzir a concentração dos inibidores, podem ser realizados tratamentos de destoxificação, por exemplo o *overliming* com Ca(OH)₂ (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

2.5. Produto Final – Bioetanol

No final de todo o processo de fermentação resulta um produto contendo álcool diluído (10-15 % etanol) que deve ser concentrado e purificado por destilação para remover a água e outras impurezas presentes. O etanol concentrado é recuperado e condensado em forma líquida, para deste modo, poder ser directamente utilizado como combustível (100 % etanol) ou em mistura com gasolina (as mais utilizadas são E10 e E85, o correspondente a 10 e 85 % de etanol, respectivamente) (Escobar *et al.*, 2009; John *et al.*, 2011).

O etanol foi sugerido pela primeira vez como combustível automóvel nos EUA na década de 1930, mas foi só após os anos 70 que foi utilizado (Agarwal, 2007). Não

obstante, o seu consumo mundial tem crescido rapidamente nos últimos anos (Figura 2.11), atingindo 3 703 milhões de litros em 2009, o correspondente a um aumento de 30 % por ano, no período de 1992-2009 (Biofuels Platform, 2011).

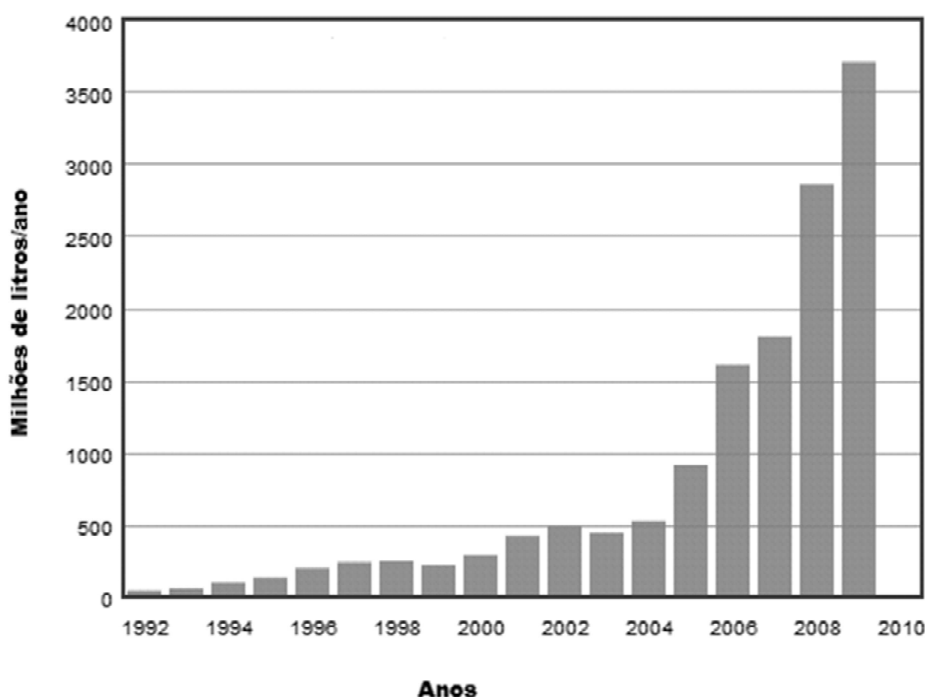


Figura 2.11 – Evolução do consumo mundial de bioetanol (milhões de litros ano⁻¹). Fonte: Adaptado de Biofuels Platform (2011).

A crescente aplicação do etanol como combustível pode estar associada ao facto de a sua utilização proporcionar vantagens a nível ambiental (redução da emissão de GEE), económico (fortalecimento da economia agrícola, criação de oportunidades de emprego e redução das necessidades de combustíveis fósseis) e também a nível de desempenho do próprio veículo, pois os álcoois apresentam um maior índice de octanas, o que se reflecte numa maior e mais eficiente capacidade do motor em fornecer energia. Os álcoois têm ainda maior calor de vaporização, portanto, reduzem a temperatura máxima no interior da câmara de combustão, levando à redução das emissões de NO_x e aumento da potência do veículo, face à gasolina (Hahn-Hägerdal, *et al.*, 2006; Agarwal, 2007).

Os principais produtores actuais são o Brasil e os EUA e, juntos correspondem a mais de 80 % da produção mundial. As fontes actualmente utilizadas por estes países são respectivamente a cana-de-açúcar e o milho (Mojović *et al.*, 2006). Todavia, em estudos já realizados, as microalgas revelaram-se novas fontes promissoras, estimando-se uma produtividade de 46 760 a 140 290 L de etanol/ha/ano, um valor

muito superior aos obtidos com outras matérias-primas, como demonstra o Quadro 2.7 (Gouveia, 2011).

Quadro 2.7 – Produtividade em etanol de diferentes matérias-primas. Fonte: Adaptado de Mussato *et al.* (2010).

Matéria-prima	Produtividade em etanol (L.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)
Cana-de-açúcar	6 190 – 7 500
Beterraba sacarina	5 010 – 6 680
Mandioca	3 310
Sorgo sacarino	3 050 - 4 070
Milho	3 460 – 4 020
Trigo	2 590
Microalgas	46 760 – 140 290

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

3.1.1. Microalga

Neste estudo foi utilizada a microalga *Spirogyra* sp., (divisão *Chlorophyta*, família *Zygnemaceae*) adquirida à Sammlung von Algenkulturen Göttingen (**SAG**) da Universidade de Göttingen, com a referência SAG 170.80. Esta microalga foi isolada em 1975 na Irlanda (SAG, 2011).

A microalga foi inicialmente inoculada em *erlenmeyers* de 50 mL, contendo 20 mL de meio de cultura.

3.1.2. Leveduras

Neste trabalho foram também usadas sete estirpes de levedura - *Saccharomyces cerevisiae* DER 24, *Saccharomyces cerevisiae* COM 1890, *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269, *Kluyveromyces marxianus* PYCC 2671, *Kluyveromyces thermotolerans* PYCC 2908, *Pichia stipitis* CBS 181 F e *Torulaspora delbrueckii* PYCC 4487.

As leveduras foram conservadas em rampas com meio de repicagem (MR), com exceção da *Pichia stipitis* CBS 181 F, para a qual foi utilizado o meio YMA. A constituição dos meios está presente no Quadro 3.1.

Quadro 3.1 – Composição dos meios MR e YMA

Nutrientes	MR (gL ⁻¹)	YMA (gL ⁻¹)
Glucose	20	11
Agar	20	20
Peptona	10	5
Extracto de levedura	5	3
Extracto de malte	-	3

3.2. Enzimas

Para a ruptura celular por métodos enzimáticos usaram-se 3 formulações enzimáticas comerciais:

- Viscozyme L (líquido), *Sigma* - complexo enzimático de *Aspergillus* sp. constituído por uma gama variada de hidrolases incluindo arabanases, celulasas, β -glucanases, hemicelulasas e xilanases.
- Carezyme 1000L (líquido), *Sigma* - celulase de *Aspergillus* sp.
- Hemicelulase (sólido em lactose), *Sigma* - hemicelulase de *Aspergillus niger*.

3.3. Meios de cultura

3.3.1. Microalga

A microalga *Spirogyra* sp. foi mantida e crescida em meio Bold modificado com a composição referida no Quadro 3.2. Antes de cada utilização, o meio sem as vitaminas foi esterilizado em autoclave (*HL-36AC*, *Newclave*) a 120 °C durante 20 min. Depois de esterilizado, adicionou-se à chama, a solução de vitaminas previamente esterilizada por filtros de microfibra de vidro GF/C: porosidade = 0,45 μm ; \varnothing = 47 mm; *Whatman*.

Quadro 3.2 - Composição do meio Bold modificado para a *Spirogyra* sp. Fonte: UTEX (2011).

Nutrientes	Concentração
NaNO ₃	250 mgL ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	25 mgL ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	75 mgL ⁻¹
KH ₂ PO ₄	175 mgL ⁻¹
NaCl	25 mgL ⁻¹
K ₂ HPO ₄	75 mgL ⁻¹
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4,5 μg L ⁻¹
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,582 μg L ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,246 μg L ⁻¹
ZnCl ₂	0,030 μg L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,012 μg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,024 μg L ⁻¹
Vitamina B1	1,1 μg L ⁻¹
Vitamina B6	0,025 μg L ⁻¹
Vitamina B12	0,135 μg L ⁻¹

3.3.2. Leveduras

Para os ensaios de crescimento de pré-inóculos de levedura foi utilizado meio MC, com a composição descrita no Quadro 3.3, cujo valor de pH é 4,5. Antes de cada utilização, o meio foi esterilizado, em autoclave a 120 °C durante 15 min, dividido em 2 soluções, nutrientes e fonte de carbono.

Quadro 3.3 - Composição do meio MC

Nutrientes	Concentração (g L ⁻¹)
Extracto de levedura	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
KH ₂ PO ₄	5
C ₆ H ₁₂ O ₆	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	5

Nos ensaios de fermentação, realizados em meio similar, para além da glucose foram utilizados outros açúcares como xilose, galactose, manose e arabinose, na mesma concentração.

3.4. Crescimento da Microalga *Spirogyra* sp.

3.4.1. Produção de Biomassa Microalgal

A microalga *Spirogyra* sp. foi cultivada em passos sucessivos começando em fotobiorreactores tubulares de vidro, tipo coluna de bolhas (V=1 L) e passando, em seguida, para fotobiorreactores em coluna de PVC (V=5 L), contendo o respectivo meio de crescimento. Em ambos os casos a agitação e arejamento da cultura foram realizados por borbulhamento de ar comprimido (Figura 3.1).



Figura 3.1 – Imagem dos fotobiorreactores tubulares de vidro (A) e dos fotobiorreactores em coluna de PVC (B) utilizados para produção de biomassa de *Spirogyra* sp.

A temperatura na sala de cultivo foi mantida constante (25 ± 1 °C) e a iluminação foi fornecida por 4 lâmpadas fluorescentes (*Philips TL-D 36 W/54-765; 400-700 nm*). Para garantir culturas descontaminadas, os reactores contendo o meio de cultura foram autoclavados durante 20 min a 120 °C. Todas as inoculações e preparações dos reactores com as culturas foram realizadas à chama.

Para seguir a evolução do crescimento das culturas de microalgas, retiraram-se amostras ao longo do tempo para determinação da biomassa seca (secção 3.7.1.) e leitura espectrofotométrica da absorvância da cultura a 540 nm ($DO_{540 \text{ nm}}$) num espectrofotómetro UV/Visível (*U-2000, Hitachi*). Foi ainda calculada a produtividade da microalga, através da equação (2) e a taxa específica de crescimento (μ) com recurso à equação 3:

$$(2) \text{Produtividade (g.L}^{-1}\text{d}^{-1}) = \frac{\text{Biomassa seca final} - \text{Biomassa seca inicial}}{\text{Tempo de cultura final} - \text{Tempo de cultura inicial}}$$

$$(3) \mu \text{ (d}^{-1}) = \frac{\ln(\frac{A_1}{A_0})}{t}, \text{ onde } A_0 \text{ corresponde à absorvância da cultura no início do ensaio, } A_1 \text{ a absorvância no tempo } t.$$

Antes da recolha da amostra acertou-se, sempre que necessário, o nível da cultura com água destilada para compensar a evaporação provocada pelo borbulhamento.

3.4.2. Efeito do Regime de Luz no Crescimento de Culturas de *Spirogyra* sp.

Para a optimização da produção de biomassa foram realizados dois ensaios de crescimento (em duplicado) em mangas de polietileno transparentes com capacidade para 20 L de meio de cultura (Figura 3.2).

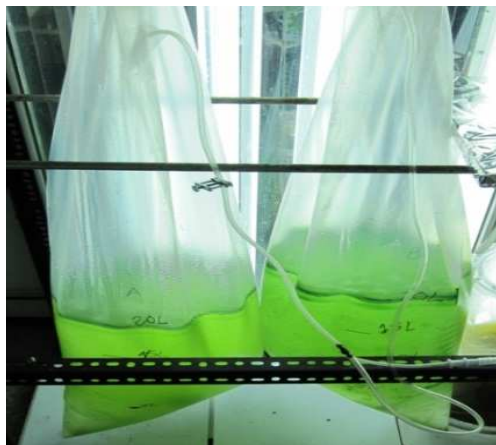


Figura 3.2 – Mangas de polietileno transparentes com capacidade para 20 L de meio de cultura utilizadas para crescimento da *Spirogyra* sp.

Nestes ensaios, as mangas foram inoculadas com cerca de 150 mgL^{-1} de biomassa proveniente de culturas crescidas em fotobiorreactores em coluna de 5 L e concentradas por centrifugação a $18\,592 \text{ g}$ durante 15 min, em centrífuga refrigerada (*Avanti J25*, Beckman).

As mangas encontravam-se sob diferentes condições de iluminação artificial fornecida por 4 lâmpadas fluorescentes: contínua e com ciclo dia-noite com um fotoperíodo de 14 h de luz regulado por um temporizador (*FDD 50*, *Fuda*). As condições de agitação, arejamento e temperatura do ensaio foram de acordo com o descrito na secção 3.4.1.

Sempre que necessário, procedeu-se à recolha de um volume conhecido de cada cultura ($V=1 \text{ L}$), aproximadamente no mesmo horário, no qual se avaliou o valor do pH e o teor em alga, por leitura espectrofotométrica a 540 nm e medida de peso seco (secção 3.7.1.). O restante volume foi filtrado com o auxílio de uma rede para plâncton e o sobrenadante repostado no reactor, após retirada de cerca de 5 mL para determinação do teor em sais (secção 3.7.3.). A biomassa concentrada foi seca em estufa ventilada a $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (*ULE-500*, *Memmert*) até peso constante e hidrolisada em autoclave a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min em presença de ácido sulfúrico 2 N. O hidrolisado foi então filtrado por filtros de 13 mm de diâmetro e $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de porosidade (*acrodisc*; *Pall Life Sciences*) e analisado para determinação da concentração em açúcares totais, recorrendo ao método do reagente fenol-sulfúrico (FS) (secção 3.7.6.).

3.5. Selecção do Método de Ruptura da Microalga

Para os ensaios de selecção do método de ruptura da microalga *Spirogyra* sp. usou-se biomassa proveniente de culturas crescidas em fotobiorreactores em coluna de 5 L, concentrada por centrifugação a 18 592 g durante 15 min em centrífuga refrigerada (4 °C), e seca numa estufa ventilada a 80 °C até peso constante. Foram testados vários métodos distintos:

- métodos físicos – moagem em moinho vibratório de esferas, homogeneização, microondas e abrasão por esferas de vidro.
- métodos físico-químicos – associação da temperatura e pressão à presença de um agente químico ácido (H₂SO₄).
- métodos físico-enzimáticos – associação da moagem em moinho vibratório de esferas ao efeito hidrolítico de enzimas comerciais.

Em cada ensaio de ruptura celular utilizou-se cerca de 0,5 g de alga seca, em duplicado. A mistura final obtida foi, em geral, centrifugada a 18 700 g durante 4 min numa centrífuga de bancada (*CT 15 E, Himac*) para a separação da alga. No sobrenadante foi avaliado o teor de açúcares totais, recorrendo ao método do FS (secção 3.7.6.) e os teores em glucose, ácidos orgânicos de cadeia curta e produtos de degradação de açúcares, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), (secção 3.7.7.). Em alguns dos casos que não envolveram hidrólise química, fizeram-se ainda determinações do teor em amido usando um *kit* enzimático de determinação de amido em alimentos (*R-Biopharm; Roche*), processando as amostras de acordo com as instruções do fabricante.

Cada lote de microalga usado foi ainda caracterizado em termos de açúcares totais, recorrendo à técnica de hidrólise ácida quantitativa (HAQ; secção 3.7.4.) seguida de análise pelo método do reagente FS (secção 3.7.5.).

3.5.1. Moagem em Moinho Vibratório de Esferas

O moinho vibratório de esferas (30 Hz; *MM 400, Retsch*) (Figura 3.3) destina-se à moagem fina e rápida de duas amostras em simultâneo, com o auxílio de esferas de aço com diâmetro de 8 mm. É constituído por dois copos de moagem (50 mL) com revestimento de aço. Neste caso, estudou-se a variação da eficiência da extracção com o tempo de duração da moagem e o número de esferas, avaliando o nível de destruição da parede celular ao microscópio (ampliação 1000x; *DM LB, Leica*) e, a

quantidade de açúcares totais (secção 3.7.6.) libertada após extracção com água (10 mL) em banho a 50 °C, sob agitação magnética (VMS-7; VWR), durante 15 min.

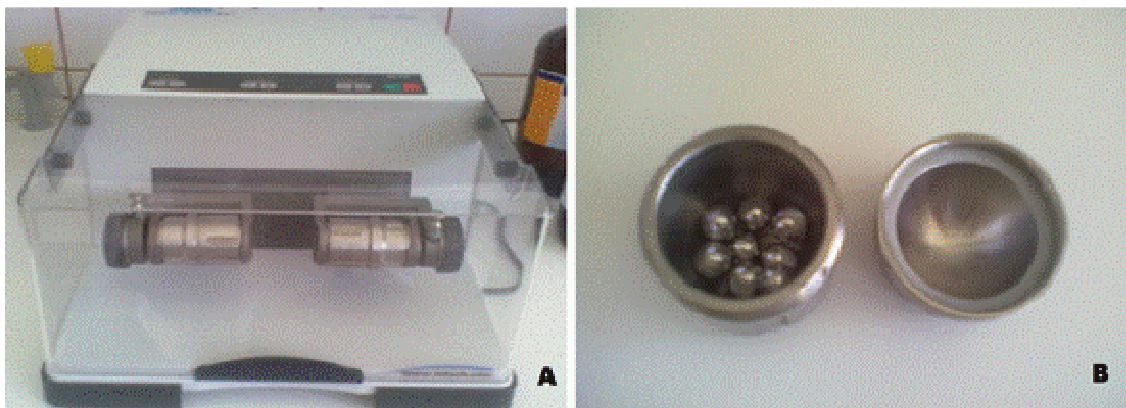


Figura 3.3 – Moinho vibratório de esferas MM 400, Retsch (A) e pormenor do copo de moagem com 8 esferas de aço (B).

3.5.2. Homogeneização

O homogeneizador (*DIAX 600, Heidolph*) (Figura 3.4) destina-se à homogeneização de tecido celular através de um sistema que actua como uma bomba centrífuga para recircular o líquido e os sólidos suspensos. O equipamento não é apropriado para a utilização em ausência de meio líquido e, por isso, adicionou-se a cada amostra de biomassa seca 10 mL de água destilada no tubo de homogeneização. O extracto celular foi sujeito à acção do homogeneizador a 13 500 rpm durante 2,5 min. Este processo foi repetido após um período de 10 min em gelo.



Figura 3.4 – Homogeneizador *DIAX 600, Heidolph*

3.5.3. Destruição por Microondas

As microondas apresentam alta frequência responsável pela vibração das moléculas polares e pelo movimento dos iões. Verifica-se como consequência a ocorrência de colisões extensas e produção de calor que acabam por possibilitar a quebra da parede celular (Lee *et al.*, 2010).

Neste estudo, cada amostra de biomassa foi sujeita a microondas (700 W; *MM 717 CKL; Kunft*) durante 10 min a seco. Os açúcares libertados foram extraídos com 10 mL de água destilada em banho a 50 °C, sob agitação magnética, durante 15 min.

3.5.4.Desintegração com Esferas de Vidro

Neste método a ruptura celular aconteceu devido à acção de esmagamento provocada pelas esferas de vidro aquando da colisão com as células (Gouveia, 2011). O método foi aplicado sob agitação em vórtice. A cada suspensão celular (0,5 g de alga seca em 10 mL de água destilada) adicionou-se 1 g de esferas de vidro e promoveu-se 5 ciclos de 1 min de agitação em vórtice, alternados com períodos de 1 min de refrigeração em banho de gelo.

3.5.5.Hidrólise Química em Autoclave

O método químico aplicado foi acompanhado por métodos físicos (aumento da temperatura e pressão). Neste estudo, foram testadas diferentes concentrações de ácido sulfúrico - 0,4 a 12 N - de modo a constatar qual a mais apropriada para a quebra da parede celular da *Spirogyra* sp.

A cada tubo com a biomassa seca adicionou-se 5 mL de H₂SO₄. Colocaram-se os tubos no autoclave pré-aquecido a 100 °C, onde permaneceram durante 30 min depois de atingir 120 °C e uma pressão de 1,2 bar. Neste caso, o hidrolisado obtido foi filtrado por filtros de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade.

3.5.6. Hidrólise Enzimática da Alga Moída

A utilização de métodos enzimáticos baseou-se no efeito hidrolítico de algumas enzimas para, dessa forma, obter um efeito de ruptura celular e libertação de açúcares. A selecção das enzimas foi efectuada de acordo com a constituição da parede celular da *Spirogyra* sp. - pectina e celulose.

Este estudo implicou uma primeira etapa de moagem da microalga (2 g por moagem) que se realizou em moinho de esferas durante um período de 5 min com 4 esferas de aço.

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em frascos rolhados do tipo *Schott* de 500 mL contendo alga seca moída (0,2 g ou 2 g), 25 mL de tampão acetato 100 mM a pH 5,5 (pH óptimo das enzimas) e 2 mL de solução de azida de sódio 2,5 % (m.v⁻¹). A cada frasco foi ainda adicionada solução de enzima em tampão acetato 100 mM (25 mL), após o que se procedeu a incubação durante 72 h em banho de água (*Haake DS; Sotel*) sob agitação magnética (*Multimatic-9N; P-selecta*).

As temperaturas a que decorreram os ensaios foram 40, 60 e 70 °C, respectivamente para as enzimas Viscozyme L (Winkler *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010), Carezyme 1000L (Aehle, 2004; Andrade *et al.*, 2011) e Hemicelulase (Smith e Hong-Shum, 2003), correspondentes às temperaturas óptimas de cada uma. A quantidade de enzima usada correspondeu, em cada caso, à quantidade necessária para assegurar uma actividade de conversão de 1 µmol de glucose.mL⁻¹ sabendo que a actividade das soluções comerciais era respectivamente 120 U.mg⁻¹, 1 U.mg⁻¹ e 1,5 U.mL⁻¹.

De cada frasco foram retiradas amostras ao longo do tempo que, após desnaturação da enzima a 100 °C durante 15 min, foram centrifugadas em centrífuga de bancada a 18 700 g durante 4 min e caracterizadas quanto ao seu teor em açúcares totais (secção 3.7.6.).

3.6. Selecção de Leveduras para a Fermentação Alcoólica de Extracto de Microalga

3.6.1. Crescimento de Inóculos

Os ensaios de crescimento de inóculos das várias leveduras foram realizados em *erlenmeyers* de 500 mL contendo 250 mL de meio (Quadro 3.3.) que foi inoculado por ançada a partir das culturas crescidas em rampa. Os *erlenmeyers*, tapados com rolhas de algodão, foram mantidos numa incubadora orbital (*G5, New Brunswick Scientific*) a 150 rpm e à temperatura de 30 °C. O controlo do crescimento foi realizado através da recolha de amostras, até ser atingida a fase estacionária, em que foram realizadas leituras espectrofotométricas a 640 nm (DO_{640 nm}) e, fazendo diluições sempre que necessário. Foi ainda avaliada a taxa específica de crescimento (µ) com recurso à equação 2, todavia, como o crescimento das leveduras é mais rápido, os resultados são apresentados em h⁻¹.

Dado que a cor do meio de inóculo interfere nas leituras espectrofotométricas, a sua influência foi eliminada subtraindo ao valor da amostra, o valor do meio sobrenadante

obtido após centrifugação da amostra a 18 700 g durante 4 min numa centrífuga de bancada.

Na fase final do crescimento foi feita a determinação da relação entre o valor da $DO_{640\text{ nm}}$ e o peso seco para cada uma das culturas (secção 3.7.2).

3.6.2. Fermentação Alcoólica em Meio Sintético

Foram realizados ensaios de fermentação alcoólica por *Saccharomyces carlsbergensis* e *Torulaspora delbrueckii* em meio MC com diferentes fontes de carbono (xilose, glucose, arabinose, manose e galactose).

Para os ensaios de fermentação as culturas a inocular devem apresentar-se em fase exponencial de crescimento. Para que tal fosse possível, prepararam-se previamente pré-culturas semelhantes às descritas na secção 3.6.1. e, após cerca de 14 h, as células foram recolhidas por centrifugação a 11 180 g durante 10 min (centrífuga *Biofuge 28 RS*, *Heraeus Sepatech*).

Depois de desprezado o sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes com água destilada esterilizada e novamente centrifugadas e, no final, foi feita a ressuspensão em água destilada esterilizada num volume necessário para obter uma concentração final de biomassa de 15 gL^{-1} . O concentrado celular foi adicionado ao meio de fermentação (2,5 mL em 250 mL) em *erlenmeyers* de 500 mL tapados com rolhas de borracha furadas com uma agulha, para a libertação de CO_2 resultante da fermentação (concentração inicial = 150 mgL^{-1}). Os ensaios foram realizados numa incubadora orbital a 150 rpm e à temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sempre que necessário foram realizadas amostragens para avaliação da concentração celular por leitura espectrofotométrica a 640 nm e, após centrifugação a 18 700 g durante 5 min em centrífuga de bancada, o sobrenadante foi congelado para posterior determinação do teor em etanol por cromatografia gasosa (secção 3.7.8.) e do teor em açúcar pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS; secção 3.7.5.).

3.7. Metodologias Analíticas

3.7.1. Determinação da Biomassa Seca de Culturas de Microalga

A determinação da biomassa seca das amostras de cultura realizou-se filtrando um volume conhecido de cultura sob vácuo (usando um balão *kitasato*, funil de *Buchner* e trompa de água) através de filtros de microfibras de vidro (GF/C: porosidade = 0,45 µm; Ø = 47 mm; *Whatman*) previamente secos em estufa (*U-10, Memmert*) a 80 °C até peso constante e tarados.

O filtro com a amostra foi seco (80 °C até peso constante) e pesado (balança analítica *AB204-S, Mettler Toledo*). O peso seco da biomassa correspondeu à diferença entre o peso final e o peso inicial do filtro.

3.7.2. Determinação da relação entre o valor da $DO_{640\text{ nm}}$ e a biomassa seca das culturas de levedura

Neste ensaio, as leveduras em fase final de crescimento foram recolhidas e concentradas por centrifugação a 18 592 g durante 10 min em centrífuga refrigerada. Depois de desprezado o sobrenadante, as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas novamente e ressuspensas num volume de água suficiente para se obter uma suspensão celular com um valor de $DO_{640\text{ nm}}$ de 5. A partir da suspensão celular concentrada prepararam-se várias outras suspensões por diluição em água também elas avaliadas a 640 nm.

Por fim, determinou-se o peso seco de um volume de 5 mL de suspensão concentrada (em triplicado), de acordo com o descrito na secção 3.7.1.

3.7.3. Determinação do Teor em Aniões por Cromatografia Iónica

Com o intuito de confirmar o consumo de nutrientes salinos por parte das microalgas ao longo do seu ciclo de vida, foi realizada a determinação do teor em aniões – cloreto (Cl^-), nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) e sulfato (SO_4^{2-}) - no meio de crescimento a diferentes tempos. Para tal, recorreu-se a um cromatógrafo (*JCS – 1000, Dionex*) equipado com supressor *ASRS – ULTRA II*, pré-coluna *AG14A (4x50 mm)*, coluna *AS14 A (4x250 mm)* e detector de condutividade, e com um volume de injeção fixo de 25 µL de amostra.

O eluente, cujo fluxo era de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, consistiu numa solução de Na_2CO_3 8 mM e NaHCO_3 1 mM, previamente filtrada por filtros de polipropileno hidrofílico ($\varnothing = 47 \text{ mm}$ e porosidade = $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ (*Pall Sciences*)) e desgaseificada em banho de ultra-sons (*ULTRASONS-H, P-Selecta*) durante 10 min.

Para calibração do método foram preparadas soluções padrão para cada um dos compostos em análise, com concentrações entre 0,1 a 30 mgL^{-1} .

3.7.4. Hidrólise Ácida Quantitativa (HAQ)

A determinação da concentração total de açúcares na microalga por HAQ foi realizada, em duplicado, sempre que se mudou de lote de microalga. A cada tubo com cerca de 0,5 g de biomassa seca adicionou-se 5 mL de H_2SO_4 72 %, ($\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$) e, colocou-se num banho termostatzado a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (*Precistern, P-Selecta*) durante 1 h. O conteúdo dos tubos foi posteriormente transferido para frascos rolhados tipo *schott* de 250 mL, a que se adicionou 139 mL de água, diluindo o H_2SO_4 para uma concentração final de 4 % ($\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$). Os frascos foram autoclavados durante 1 h a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e a 1,2 bar e, por fim, filtrou-se o hidrolisado obtido por filtros de 13 mm de diâmetro e $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de porosidade para posterior determinação da concentração em açúcares totais pelo método do reagente FS (secção 3.7.6).

3.7.5. Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores foi estimada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (Miller, 1959), vulgarmente conhecido pelo método do DNS.

O reagente de DNS preparou-se dissolvendo num litro de água destilada 10 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico, 16 g de hidróxido de sódio e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio. Filtrou-se a solução e conservou-se em frasco escuro.

O procedimento experimental consistiu em adicionar a $500 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra, adequadamente diluída, igual volume de reagente de DNS e, após agitação em vórtice, colocou-se num banho de água a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min. Findo este tempo, e após arrefecimento durante 10 min à temperatura ambiente, diluiu-se a mistura com 5 mL de água destilada. Após nova homogeneização procedeu-se a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Para o branco, substituiu-se a amostra por água destilada e seguiu-se o mesmo procedimento.

A concentração em açúcares redutores nas amostras foi obtida a partir de uma recta de calibração, com concentrações entre 0,1 a 1,5 gL⁻¹ (Figura I.1; Anexo I).

3.7.6. Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Totais

A concentração de açúcares totais foi estimada pelo método do reagente fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

Como reagente para o método preparou-se uma solução aquosa de fenol 5 % (m.v⁻¹), pesando numa balança (*PM 4600, Mettler*) 50 g de fenol cristalino que se dissolveu num litro de água destilada. Conservou-se a solução em frasco escuro. Foi ainda utilizado ácido sulfúrico concentrado.

O procedimento experimental consistiu em adicionar 1 mL de amostra (apropriadamente diluída) a cada tubo de ensaio, previamente tratado com mistura cromo-sulfúrica, seguido de igual volume de solução de fenol. Homogeneizou-se e acrescentou-se rapidamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após nova agitação em vórtice, deixou-se reagir durante 10 min à temperatura ambiente, após o que se arrefeceu a mistura durante 15 min em banho de água, porque a reacção é exotérmica. Antes da leitura da absorvância a 490 nm, homogeneizou-se a mistura uma última vez, pois o ácido sulfúrico é muito viscoso e torna-se difícil conseguir obter uma solução homogénea.

A concentração em açúcares totais, referida em termos de teor de glucose, foi obtida a partir de uma recta de calibração, com concentrações de glucose entre 10 e 100 mg L⁻¹ (Figura I.2; Anexo I).

3.7.7. Identificação e Quantificação de Açúcares e Seus Produtos de Degradação por HPLC

A identificação e quantificação de alguns açúcares e seus produtos de degradação, assim como de ácidos orgânicos presentes nos hidrolisados da microalga foram realizadas por HPLC.

Para tal recorreu-se a um cromatógrafo (*LaChrom, Merck*) constituído por bomba (*L-7100*), forno (*L-7350*), detector de índice de refração (*L-7490*) e amostrador automático (*L-7200*), e equipado com uma coluna Aminex HPX-87H (*Bio-Rad*

Laboratories) e um volume de injeção de 5 μL . A temperatura utilizada para a coluna foi 50 $^{\circ}\text{C}$.

O eluente utilizado, a um fluxo de 0,5 mL min^{-1} , consistiu numa solução de H_2SO_4 5 mM, previamente filtrada por filtros de polietersulfona hidrofílica ($\varnothing = 47 \text{ mm}$ e porosidade = 0,2 μm ; *Supoc 200, Pall Life Sciences*) e desgaseificada.

Para calibração foram preparadas soluções padrão de cada um dos compostos em análise numa gama de concentrações entre 0,1 e 10 g L^{-1} e 0,1 e 5 g L^{-1} , para açúcares e outros produtos, respectivamente.

3.7.8. Avaliação do Teor em Etanol por Cromatografia Gasosa

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa (CG) num cromatógrafo (5890, *Hewlett-Packard*) equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor *on-column* e uma coluna de enchimento (4 % Carbowax 20 M, 1 % ácido trimesílico, 80-120 Carbopack BDA) de 2 m de comprimento e 1/8' de diâmetro interno. Antes do início da análise configuraram-se as temperaturas do injetor, coluna e detector para 150 $^{\circ}\text{C}$, 110 $^{\circ}\text{C}$ e 200 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O gás de arrastamento utilizado era o hélio.

Para calibração preparou-se um padrão de etanol de 1,5 g L^{-1} a que se adicionou uma solução de 2-propanol de concentração 1 g L^{-1} , como padrão interno, tal como a todas as amostras (volume de injeção = 1 μL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi estudada uma nova matéria-prima para produção de bioetanol em alternativa aos materiais baseados na agricultura – as microalgas - que não compete com alimentos por terrenos aráveis ou águas potáveis. A alga microscópica de água doce *Spirogyra* sp. foi a escolhida, tendo em vista a sua riqueza em polissacáridos, nomeadamente amido e celulose (Eshaq *et al.*, 2011).

4.1. Crescimento da Microalga *Spirogyra* sp.

4.1.1. Produção de Biomassa Microalgal

A microalga *Spirogyra* sp. foi inicialmente cultivada em fotobiorreactores tubulares de vidro e, foi seguida a evolução do seu crescimento através da determinação da biomassa seca e leitura espectrofotométrica da absorvância da cultura a 540 nm.

O crescimento da microalga foi contínuo. A fase exponencial ocorreu até ao 26º dia de cultura ($\mu = 0,15 \text{ d}^{-1}$), altura em que foi atingido a concentração máxima de biomassa seca de $2,47 \pm 0,04 \text{ gL}^{-1}$. A fase de morte teve início ao 29º dia e no final do ensaio (50º dia) a concentração de biomassa era de $1,85 \pm 0,18 \text{ gL}^{-1}$ (Figura 4.1).

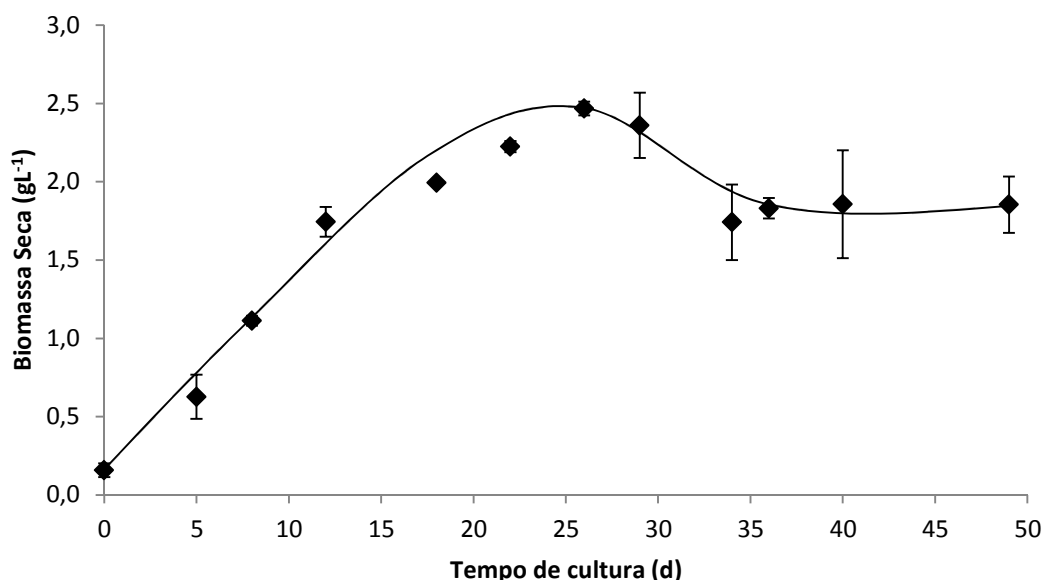


Figura 4.1 - Crescimento de uma cultura de *Spirogyra* sp. num reactor tubular de vidro. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.

A produtividade máxima da microalga ocorreu entre o 5º e o 12º dia de ensaio ($p_{\text{máx}} = 0,16 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). A produtividade global da microalga, durante os 26 d de crescimento, determinada através da aplicação da equação 2 (secção 3.4.1.), foi de $0,09 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Estes resultados mostraram que a microalga *Spirogyra* sp. apresenta máximos de concentração de biomassa e uma produtividade global semelhantes a outras microalgas já estudadas (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 – Concentração máxima de biomassa microalgal e produtividade para diferentes microalgas. Adaptado de Gouveia e Oliveira (2009).

Microalga	Biomassa seca máx (gL^{-1})	Produtividade ($\text{gL}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
<i>Spirulina máxima</i>	3,1	0,21
<i>Chlorella vulgaris</i>	3,0	0,18
<i>Scenedesmus obliquus</i>	2,0	0,09
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3,6	0,12
<i>Nannochloropsis</i> sp.	2,5	0,09
<i>Neochloris oleabundans</i>	2,0	0,09

Esta microalga não apresentava uma aparência homogénea (Figura 4.2). Pelo contrário, eram visíveis pequenos aglomerados de filamentos que dificultavam a toma de uma amostra homogénea, o que se repercutiu numa baixa correlação entre os valores de $\text{DO}_{540 \text{ nm}}$ e de biomassa seca, como ilustra a recta de calibração traçada, cujo coeficiente de correlação apresentava um valor baixo ($R^2=0,8835$) e que mostra valores elevados da medida do desvio padrão para cada ponto (Figura 4.3).



Figura 4.2 – Cultura de *Spirogyra* sp. filtrada para determinação da biomassa seca, onde são visíveis os aglomerados formados pela microalga.

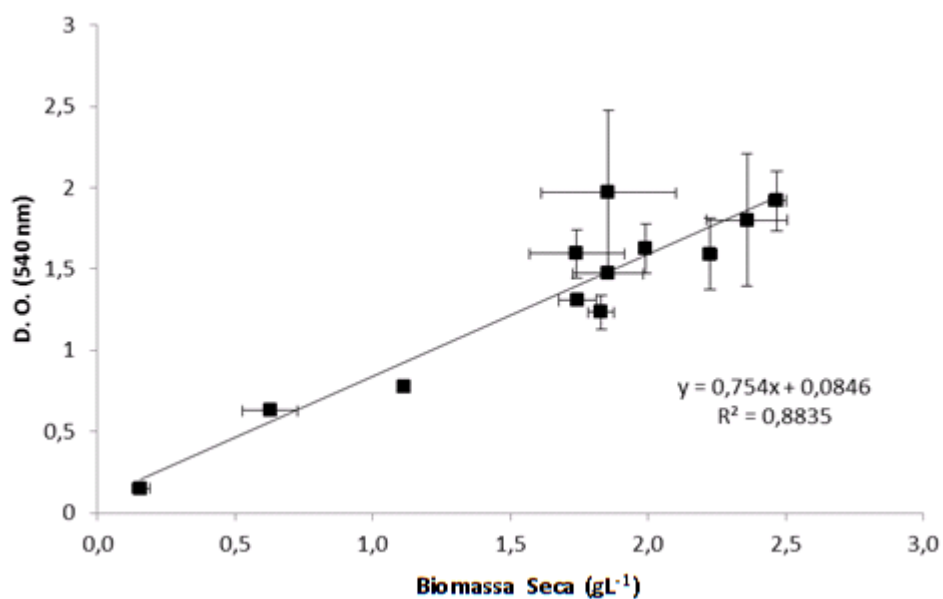


Figura 4.3 - Correlação entre a biomassa seca e $DO_{540\text{ nm}}$ de uma cultura de *Spirogyra* sp. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.

Os resultados mostraram ainda que o pH do meio de crescimento, cujo valor inicial era 6,5, subiu inicialmente cerca de um valor ($\text{pH} \approx 7,5$) e manteve-se estável ao longo dos restantes 42 dias de cultura (Figura 4.4).

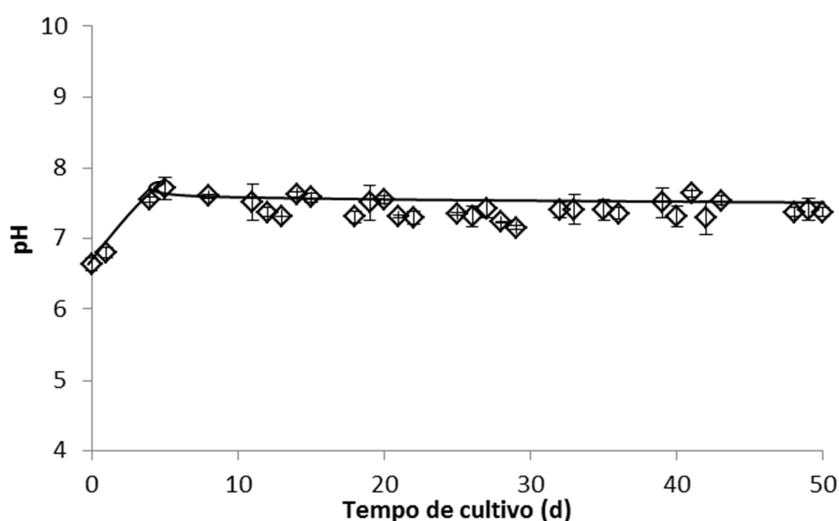
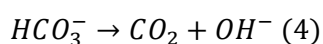


Figura 4.4 - Evolução do pH numa cultura de *Spirogyra* sp. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.

Segundo Dubinsky e Rotem (1974), as microalgas são conhecidas por influenciarem o pH do meio onde estão inseridas, isto é, durante o dia o pH tem tendência a aumentar como consequência da assimilação de CO_2 por parte da microalga e durante a noite

ocorre um decréscimo do pH, devido a processos respiratórios dos microrganismos. Azov (1982) refere ainda que a alcalinização do meio está associada à dissociação do CO₂ atmosférico na água, dando origem ao ião bicarbonato (HCO₃⁻). Estando este elemento em predominância no meio de cultura, é utilizado pelas microalgas como fonte de carbono, fazendo com que haja a libertação de um ião hidróxido (OH⁻), de acordo com a equação 4:



4.1.2. Características Morfológicas da Microalga *Spirogyra* sp.

Esta microalga apresentou características muito particulares, nomeadamente na sua aparência e no seu ciclo de vida. A aparência mais habitual da *Spirogyra* sp., referida na secção 4.1.1. (Figura 4.2), poderá estar relacionada com um movimento típico das microalgas eucariotas filamentosas, designado por movimento fototático, que pode ser resultado da combinação de um movimento de deslize entre filamentos ao longo do seu comprimento (aumentando a área de contacto) (Figura 4.5 A) e de um movimento de curvatura de diversos filamentos unidos (Figura 4.5 B), proporcionando a exposição a temperaturas e níveis de luz mais elevados (Tanaka *et al.*, 1977; Kim *et al.*, 2004). Esta situação verificou-se sobretudo a partir do 12º dia de cultura, em ambos os ensaios realizados nos fotobiorreactores tubulares de vidro.

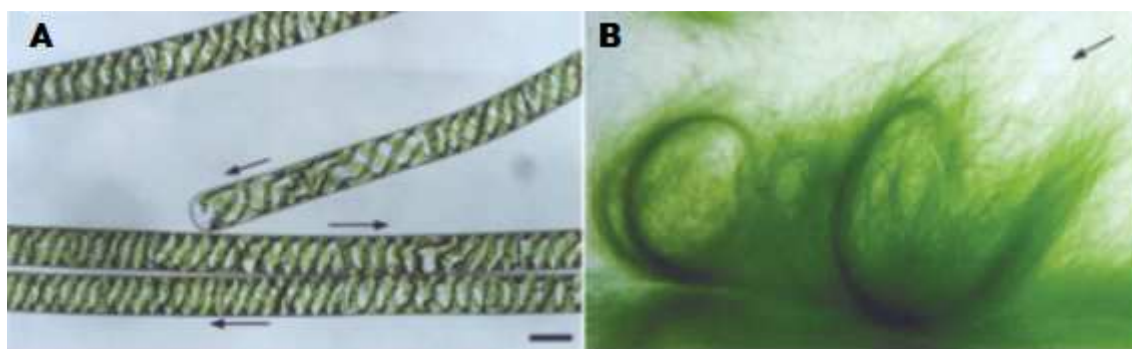


Figura 4.5 - Movimento fototático de *Spirogyra* sp. (A) - movimento de deslize entre os filamentos, onde as setas indicam a direcção do movimento dos filamentos. (B) - curvatura de filamentos em direcção à luz, onde as setas mostram a direcção da luz. Fonte: Kim *et al.*, 2004.

Na última monografia sobre *Spirogyra*, que data de 1984, foram listadas 386 espécies. São dois os principais motivos que estão associados a esta diversidade. Por um lado, os estágios reprodutivos encontrados foram descritos como novas espécies, uma vez que a sua descrição não coincidia com a das espécies existentes, devido à mudança

de morfologia dos filamentos ao longo do tempo e, por outro lado, devido à poliploidia¹ da microalga (Hainz *et al.*, 2009).

Hainz *et al.* (2009) referem ainda que são vários os factores que podem contribuir para esta variância: capacidade tampão, nível trófico, teor de nitratos e nitritos e fornecimento de energia (intensidade e regime de luz). Simons e van Beem (1990) e Parmentier (1999) defendem que a altura do ano influencia o desenvolvimento da *Spirogyra* sp., mencionando que o processo de conjugação (reprodução sexuada) ocorre especialmente entre os meses de Maio e Junho, verificando-se neste período um pico na libertação dos esporos do interior do filamento.

Os resultados obtidos neste trabalho vão de encontro com o defendido por Simons e van Beem (1990) e Parmentier (1999), tendo-se verificado alterações fenotípicas (Figura 4.6). Do ponto de vista macroscópico a principal alteração visível nas culturas de *Spirogyra* sp. foi a nível da cor. Durante o mês de Maio as culturas foram gradualmente adquirindo uma tonalidade acastanhada. Nos restantes meses do ano, as culturas apresentaram uma coloração verde mais clara (antes de Maio) e mais escura (depois de Junho), como ilustra a Figura 4.6 (A), (B) e (C). Pelas observações microscópicas realizadas constatou-se ainda que durante o período de Fevereiro a início de Maio a microalga apresentava longos filamentos e a partir desta altura e até finais de Junho a microalga encontrava-se em modo de reprodução sexuada, sendo visíveis zigósporos, por vezes em colónias de pequenas dimensões, de cor acastanhada. A partir do mês de Julho, já eram visíveis novos filamentos, fruto de repetidas divisões mitóticas (Figura 4.6 (D), (E) e (F)) (Mahendra, 2008).

¹ Coexistência de células n e $2n$, correspondente a filamentos e células esféricas, respectivamente.

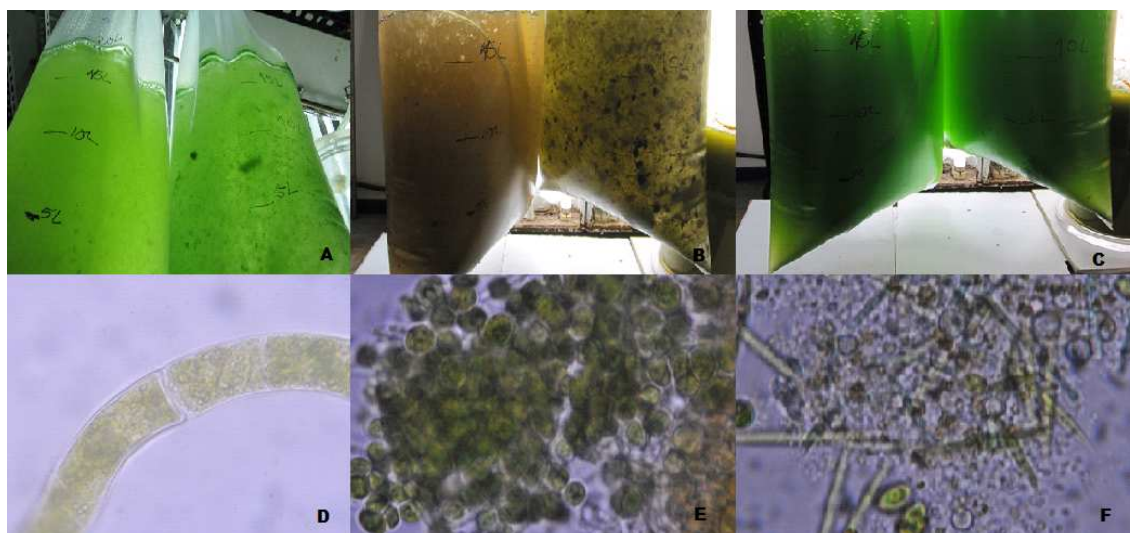


Figura 4.6 - Alterações fenotípicas observadas na cultura de *Spirogyra* sp. ao longo dos meses de ensaio. As imagens microscópicas apresentam ampliação x1000.

Esta microalga apresentou ainda uma outra particularidade visível ao longo de todo o tempo de cultura, que foi um aumento gradual da biomassa na parte superior das mangas. Este crescimento poderá estar associado com uma temperatura superior da água naquela zona e com uma maior disponibilidade da luz. Ishida *et al.* (2006), obtiveram resultados semelhantes com esta alga e em circunstâncias análogas, em que as rochas do Lago Biwa, no Japão, desempenharam o mesmo papel que a superfície lateral das mangas.

4.1.3. Efeito do Regime de Luz no Crescimento de Culturas de *Spirogyra* sp.

Como já foi descrito por vários autores, existem determinados factores que podem interferir no crescimento de culturas de microalgas, nomeadamente a temperatura, o pH, a densidade da biomassa, a composição do meio e a luz (intensidade e regime) (Olguin *et al.*, 2001; Renaud *et al.*, 2002; Doucha e Lívanský, 2009).

Neste estudo realizado em mangas de polietileno com capacidade para 20 L de meio, avaliou-se a interferência do regime de luz (contínuo vs. ciclos dia-noite) no desenvolvimento da microalga *Spirogyra* sp., já que este é um factor determinante na taxa fotossintética das microalgas.

Em cada caso o ensaio foi realizado em duplicado e as mangas foram inoculadas com 150 mgL^{-1} de biomassa proveniente de crescimentos num reactor em coluna de PVC.

Ao longo dos estudos do crescimento da microalga *Spirogyra* sp. verificou-se que o meio usado, adequado para esta microalga (UTEX, 2011), é facilmente contaminável e

a microalga não tem capacidade de crescimento para se sobrepor à contaminação. No primeiro ensaio de cultura em manga, após verificação de uma alteração na cor de verde claro para verde azulado ao fim de alguns dias de cultura (5 dias) e após avaliação microscópica, detectou-se a presença de uma cianobactéria (Figura 4.7).

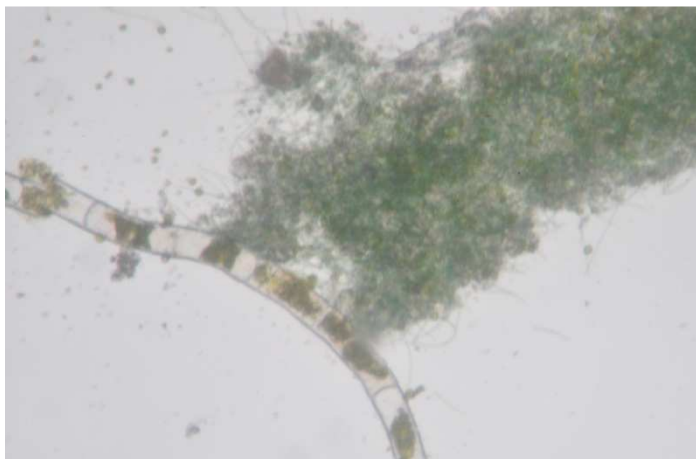


Figura 4.7 – Imagem microscópica da cultura de microalga *Spirogyra* sp. contaminada por uma cianobactéria ao fim de 5 dias de cultura (ampliação x1000).

Procedeu-se a descontaminação das mangas com lixívia e incorporou-se no sistema de arejamento um filtro de vidro contendo algodão e esterilizado. No dia 7 de Junho reinocularam-se as mangas.

Os resultados na Figura 4.8 mostram o crescimento da microalga, nas diferentes condições de iluminação. Nos ensaios com iluminação artificial contínua, observou-se apenas uma fase exponencial entre o 1º e o 5º dia ($\mu = 0,13 \text{ d}^{-1}$), onde a concentração máxima de biomassa seca atingida foi de $0,29 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}$. A fase de morte teve então início e no final do ensaio (54º dia), a concentração de biomassa era de $0,13 \pm 0,03 \text{ gL}^{-1}$. Nos ensaios com iluminação artificial sob o efeito de ciclo dia-noite com 14 h de luz, verificou-se a existência de duas fases exponenciais. A primeira ocorreu entre o 2º e 5º dia de cultura ($\mu = 0,04 \text{ d}^{-1}$), onde a concentração máxima de biomassa seca atingida foi de $0,20 \pm 0,04 \text{ gL}^{-1}$, inferior ao alcançado na fase exponencial do primeiro ensaio. A segunda fase exponencial ocorreu entre o 29º e o 41º dia de cultura ($\mu = 0,05 \text{ d}^{-1}$) e a concentração máxima de biomassa seca atingida foi de $0,34 \pm 0,05 \text{ gL}^{-1}$. A fase de morte teve início seguidamente e no final dos ensaios (50º dia) a concentração de biomassa era de $0,11 \pm 0,04 \text{ gL}^{-1}$.

Comparando o ensaio em manga com iluminação contínua com o ensaio em reactor de vidro (Figura 4.1), sob o mesmo regime de iluminação, observou-se no primeiro caso um crescimento mais lento, tendo-se atingido um valor máximo de concentração

em biomassa muito mais baixo. A razão para esta observação poderá resultar da diferente permeabilidade do material do reactor à radiação. Wang *et al.* (2007) defendem que o comprimento de onda incidente pode influenciar o crescimento das microalgas verdes. Em ensaios realizados com a microalga *Spirulina platensis* constatou-se que a luz vermelha promovia maiores taxas específicas de crescimento, em relação à azul.

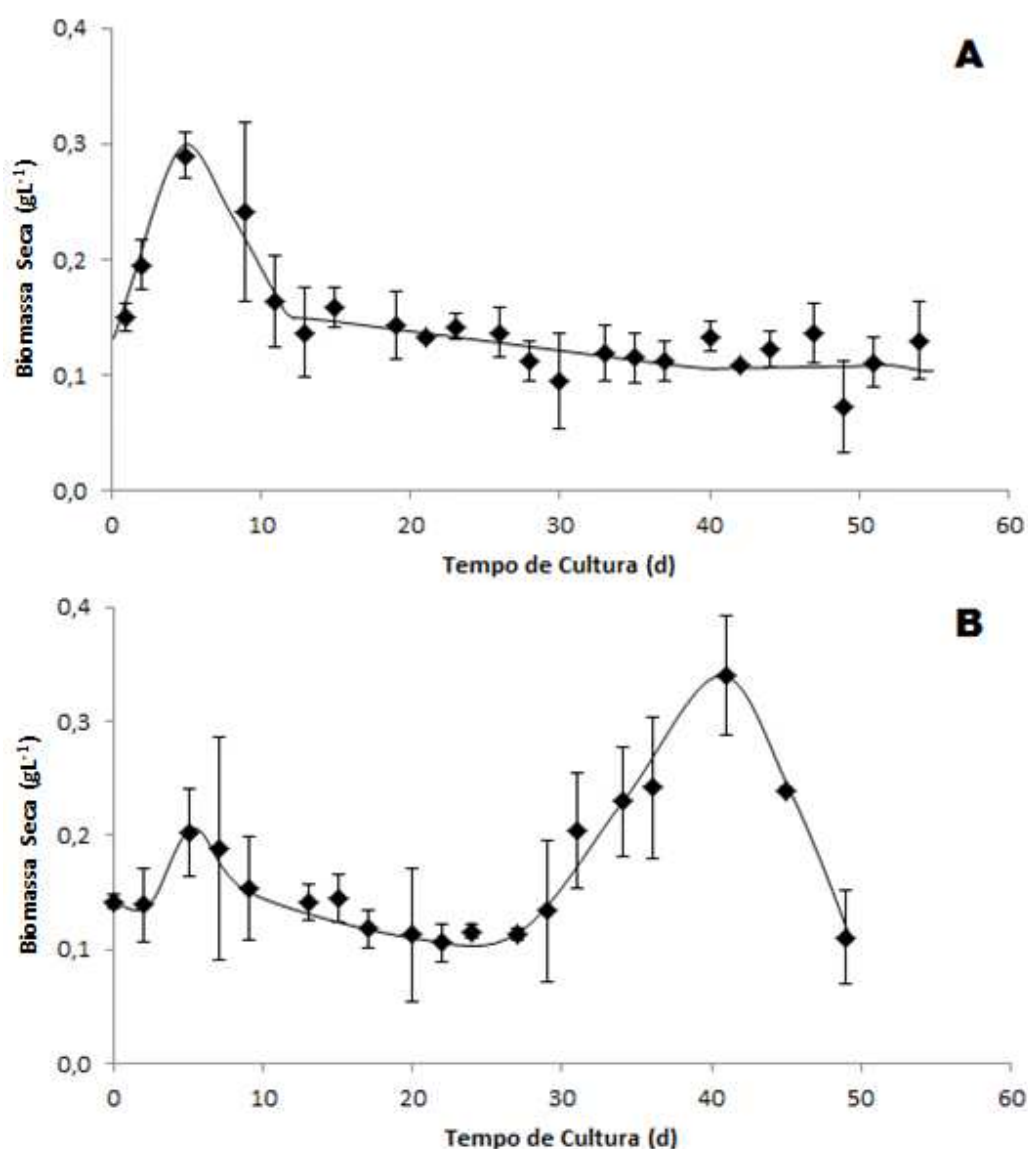


Figura 4.8 - Crescimento de uma cultura de *Spirogyra* sp. em mangas de polietileno sob condições de iluminação artificial contínua (A) e com ciclo dia-noite (14 h/10 h) (B). Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.

Com este estudo constatou-se que a iluminação contínua proporciona maiores taxas de crescimento da microalga, todavia, a concentração máxima de biomassa ocorre sob o efeito de ciclos dia-noite, neste caso, um ciclo de 14 h de luz e 10 h de noite. Em

estudos já realizados foram obtidos resultados semelhantes, contudo o motivo que levou a que tal acontecesse não foi consensual (Bouterfas *et al.* 2006, Lee e Lee 2001).

Para Bouterfas *et al.* (2006) a concentração de biomassa perante o efeito de ciclos dia-noite é superior, já que é durante a fase escura que os compostos que são produzidos na fase fotossintética (ATP e NADPH) são utilizados na síntese de moléculas metabólicas essenciais para o crescimento da microalga, para além de que existem enzimas envolvidas no ciclo das pentoses e na fixação de CO₂ que só se encontram activas durante esta fase. Lee e Lee (2001) defendem que a existência de períodos de escuridão pode dificultar as condições de desenvolvimento para microalgas autotróficas, fazendo com que as células atinjam tamanhos superiores e, concomitantemente, concentrações superiores.

Os resultados obtidos encontram-se mais próximos do descrito por Bouterfas *et al.* (2006), na medida em que parece ter ocorrido uma fase de morte prematura das culturas sob iluminação contínua, possivelmente por não terem capacidade de fixar o CO₂ eficientemente e/ou por terem as suas reacções catabólicas limitadas ou mesmo inibidas, devido à ausência da fase escura.

As taxas específicas de crescimento obtidas encontram-se abaixo dos resultados publicados por Bouterfas *et al.* (2006), aquando do estudo do efeito da luz (intensidade e regime) no crescimento de três microalgas verdes. Mediante um fotoperíodo de 15 h de luz foram atingidas taxas de 1,55 d⁻¹ para *Selenastrum minutum*, 1,59 d⁻¹ para *Coelastrum microporum f. astroidea* e 0,88 d⁻¹ para *Cosmarium subprotumidum*. Com iluminação contínua os resultados foram 1,88 d⁻¹ para *Selenastrum minutum*, 1,72 d⁻¹ para *Coelastrum microporum f. astroidea* e 0,88 d⁻¹ para *Cosmarium subprotumidum*.

Em ambas as situações (Figura 4.8), a primeira fase exponencial correspondeu à altura em que a *Spirogyra* sp. se reproduzia sexualmente (secção 4.1.2.), pelo que este poderá ser um factor responsável nas diferenças encontradas entre os resultados. Bouterfas *et al.* (2006) refere ainda que o tamanho da própria célula pode influenciar a taxa de crescimento, tendo observado taxas superiores nos microrganismos de menores dimensões. A *Spirogyra* sp. apresentou neste trabalho taxas específicas de crescimento mais baixas que, poderão então, ser devidas ao facto de ser uma microalga cujo comprimento se pode estender até vários centímetros.

Um outro aspecto detectado foi a alcalinização do meio ao longo da fase de crescimento da biomassa, para valores de pH de cerca de 9, em ambos os casos de iluminação contínua e com ciclos dia-noite. Este aumento no valor de pH ocorreu em

duas alturas, durante a fase inicial de crescimento (de 6,9 para 8,1), e após o 40º dia e o 24º dia, respectivamente, com iluminação contínua e com ciclos dia-noite (Figura 4.9).

Tal como referido na secção 4.1.1., nos crescimentos com microalgas, o pH tem tendência a aumentar durante o dia como consequência da assimilação de CO₂ por parte do microrganismo, durante a noite ocorre um decréscimo do pH, devido a processos respiratórios. Repetindo este efeito diariamente, ao fim de 3-4 semanas as culturas podem atingir valores de pH compreendidos entre 8,5 e 11. No caso da *Spirogyra* sp., constatou-se que o pH final em ambas as situações se situa dentro do intervalo supramencionado. Um aumento, embora não tão elevado, já havia também sido observado no crescimento de *Spirogyra* sp. em reactor de vidro (Figura 4.4).

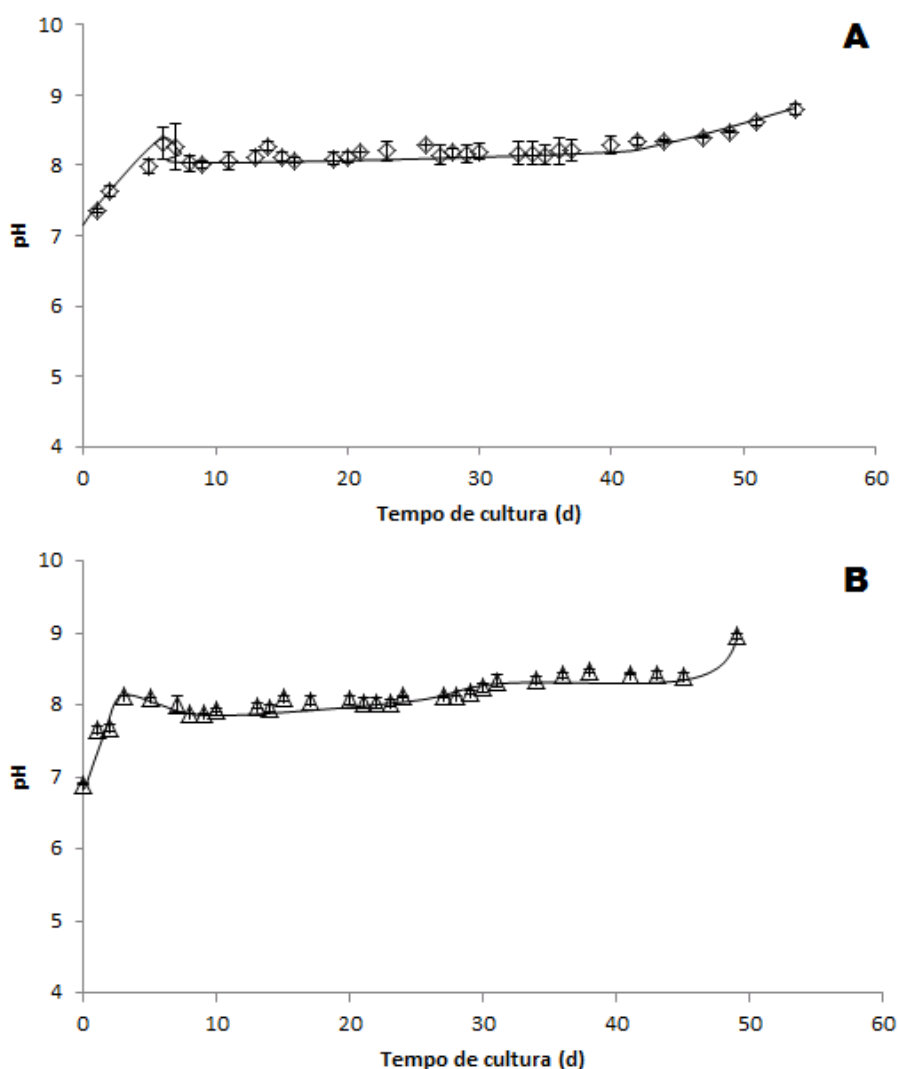


Figura 4.9 – Evolução do pH na cultura de *Spirogyra* sp., mediante iluminação artificial contínua (A) e com ciclo dia-noite (14 h/10 h) (B). Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.

Dos nutrientes fornecidos através do meio Bold modificado, verificou-se sobretudo o consumo de nitratos e fosfatos, não havendo praticamente consumo de cloretos e sulfatos (Figura 4.10). Tavares (2009) e Miranda (2011) também observaram o consumo de nitratos e fosfatos em culturas de microalgas dos géneros *Botryococcus* e *Scenedesmus* para produção de biodiesel e bioetanol, respectivamente.

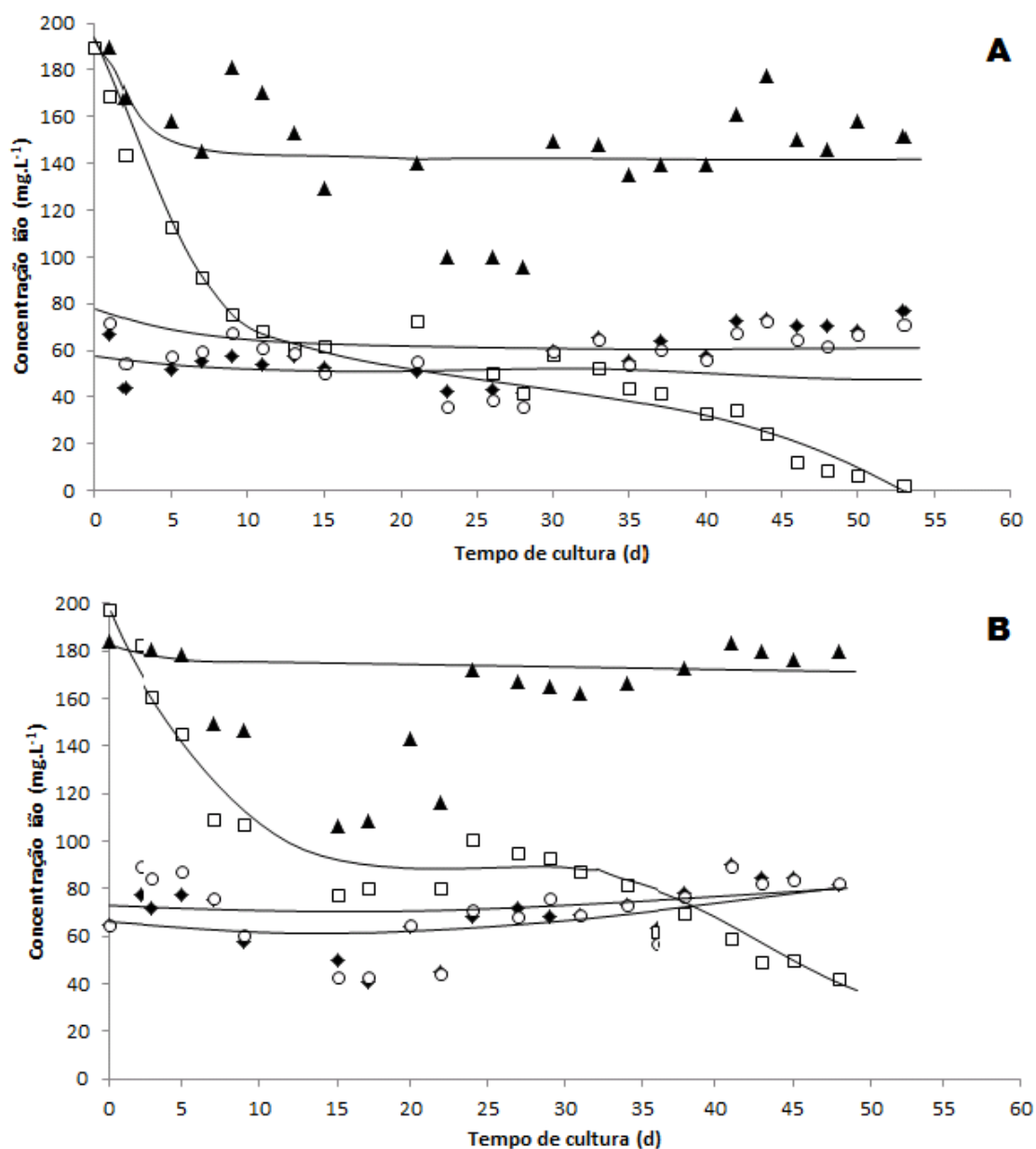


Figura 4.10 - Evolução da concentração de sais no meio de cultura de *Spirogyra* sp. crescida sob condições de iluminação artificial contínua (A) e com ciclo dia-noite (14 h/10 h) (B): cloretos (◆), nitratos (□), fosfatos (▲) e sulfatos (○). Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado.

A Figura 4.10 tem presente a remoção de fosfatos pela microalga ao longo do tempo de cultura, onde se verifica que apenas as culturas continuamente iluminadas apresentaram consumo (38 mgL^{-1} ; 20 % do valor inicial).

Relativamente ao consumo de nitratos, verificou-se que, a concentração destes nutrientes foi reduzida de 190 para 12 mgL^{-1} (93,7 %), em 45 dias de cultura sob iluminação constante, em contraste com os ensaios na presença de ciclos dia-noite, onde se verificou uma redução para 45 mgL^{-1} (76,3 %), durante idêntico período. De salientar que em condições de iluminação contínua, se detectou a depleção de nitratos ao 53º dia de cultura. Lee e Lee (2001) obtiveram resultados semelhantes aquando de um estudo realizado com *Chlorella kessleri* em tratamentos de águas residuais: redução de 31,6 e 14 mgL^{-1} de nitratos sob iluminação contínua e sob o efeito de ciclos dia-noite (12 h/12 h), respectivamente.

As diferenças obtidas em ambos os ensaios sugerem que a luz estimula o consumo de nitratos, o que poderá estar associado ao facto de que compostos como o ATP e o NADPH (cuja constituição engloba azoto) imprescindíveis para o desenvolvimento das microalgas, são produzidos durante a fase fotossintética, como já foi referido anteriormente.

4.1.4. Avaliação da Síntese de Açúcares pela Microalga *Spirogyra* sp.

Para que a produção de bioetanol seja viável é necessário avaliar quais as condições mais apropriadas para obter culturas densas em biomassa e ricas em açúcares. Assim, durante os ensaios referidos na secção 4.1.3. realizaram-se determinações do teor em açúcares da biomassa microalgal. A extracção destes compostos foi realizada com cerca de 0,5 g de biomassa seca através da hidrólise em autoclave na presença de ácido sulfúrico 2 N, condição óptima definida na secção 4.2.2. Os resultados obtidos são apresentados em percentagem mássica de açúcares totais extraídos, quantificados pelo método do reagente FS (secção 3.7.6.; Anexo I) considerando a glucose como o açúcar padrão de referência (grama equivalente de glucose por grama de biomassa seca de microalga (% g eq_{glu}.g biomassa⁻¹)).

A centrifugação foi o método de colheita de biomassa escolhido inicialmente, devido à sua eficiência, pois permite a obtenção de uma concentração de biomassa final elevada, diminuindo assim a possibilidade de degradação da mesma e aumentando, por outro lado, a eficiência da secagem.

Durante o mês de Junho, período em que a microalga se encontrava em modo de reprodução sexuada, foi sempre possível a aplicação da técnica de centrifugação, a mais favorável pois a perda de biomassa era reduzida (Figura 4.11 A). Com esta técnica foi possível obter concentrados de biomassa com teores de humidade de apenas 77 % (m.m⁻¹) o que permitiu tempos de secagem da microalga, em estufa ventilada a 80 °C até peso constante, em média, de 2 dias.

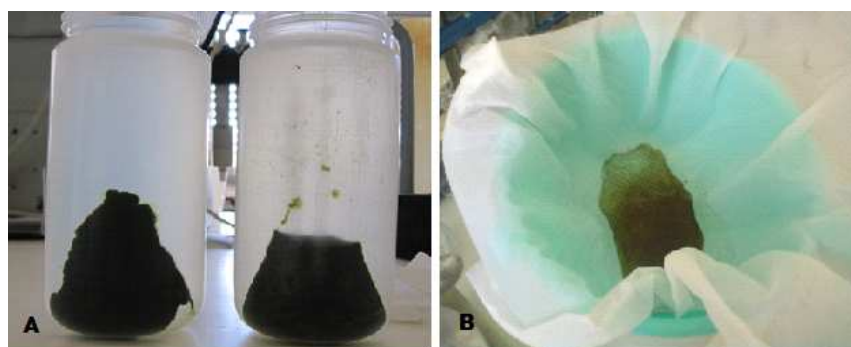


Figura 4.11 - Técnicas utilizadas para a recuperação da biomassa de *Spirogyra* sp.: A - Centrifugação a 18 592 g e B - Filtração com rede para plâncton.

Todavia, após este período formaram-se em maior quantidade células filamentosas da *Spirogyra* sp. (secção 4.1.2.) que não apresentavam características de sedimentação/centrifugação favoráveis e, consequentemente, não formavam um *pellet* consistente.

Segundo Molina-Grima *et al.* (2003) a filtração é o método adequado para a recuperação de microalgas com maiores dimensões, nomeadamente *Coelastrum proboscideum* e *Spirulina platensis*. Uma vez que a *Spirogyra* sp. também apresenta dimensões consideráveis (secção 2.2.), substituiu-se a centrifugação pela técnica de filtração com auxílio de uma rede para plâncton (Figura 4.11 B). Nestas condições, obtiveram-se concentrados celulares com um teor de humidade de cerca de 93 % (m.m⁻¹) e o período necessário de secagem da microalga, foi, em média, de 4 dias.

No que diz respeito à recuperação da biomassa de *Spirogyra* sp., verificou-se portanto que não existe uma metodologia ideal. A metodologia que permite maior recuperação é dependente do estágio fisiológico de desenvolvimento em que a microalga se encontra, da idade da cultura, do pH e de outros parâmetros da cultura (Molina-Grima *et al.*, 2003).

Relativamente à produção de açúcares verificou-se que no momento inicial de inoculação da cultura, o teor em açúcares era elevado – 24 % em condições de iluminação contínua e 35 % sob a influência de ciclos dia-noite - Figura 4.12. Esta

situação pode ter sido devida ao facto dos inóculos utilizados se encontrarem em fase de acumulação de açúcares.

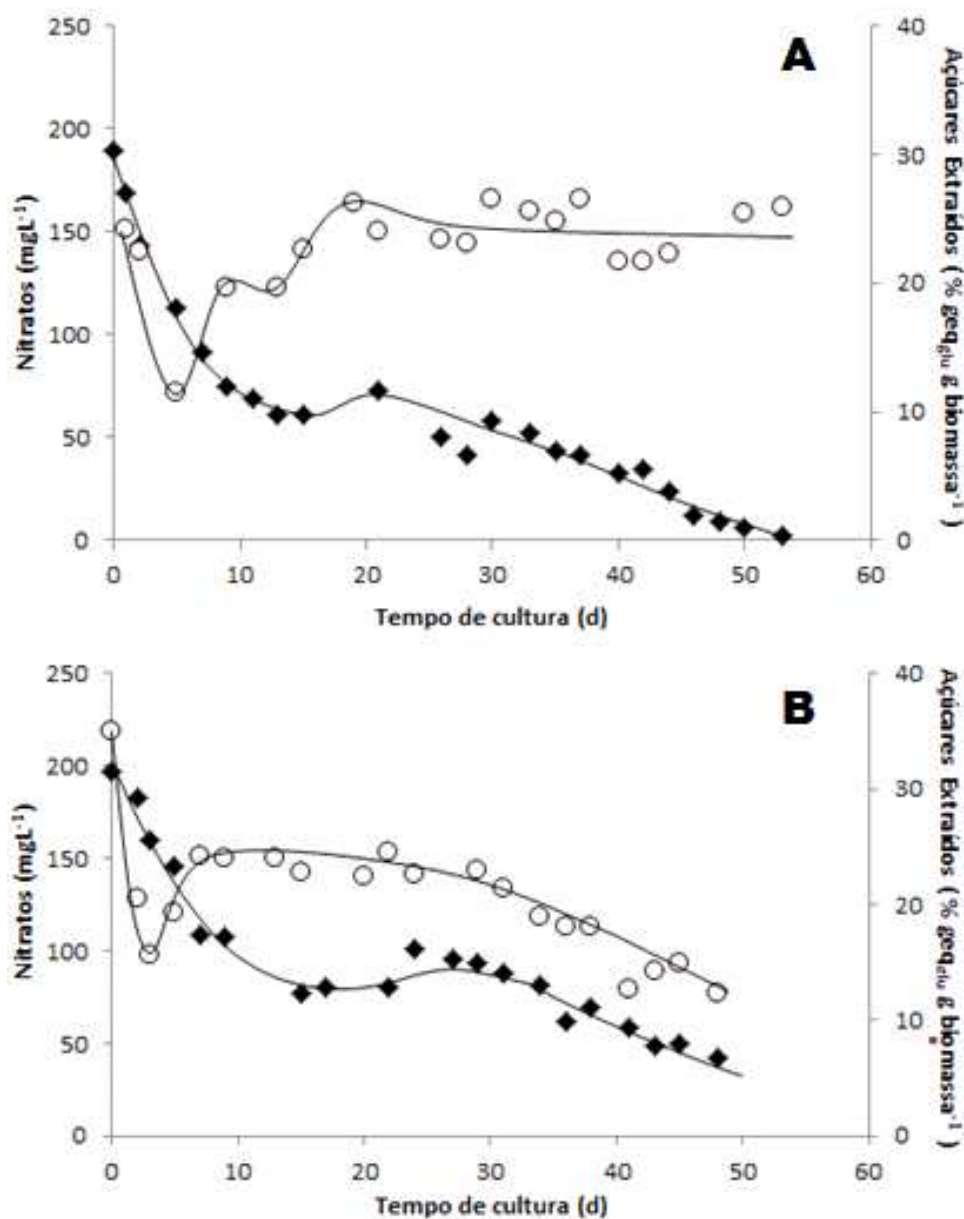


Figura 4.12 – Evolução do teor em açúcares (O) e concentração em nitratos (◆) ao longo do tempo de desenvolvimento da cultura, sob condições de iluminação artificial contínua (A) e com ciclo dia-noite (14 h/10 h) (B). Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado.

Seguiu-se um decréscimo no teor de açúcares até 12 %, correspondente ao 5º dia de ensaio em condições de iluminação contínua, e um decréscimo até 16 %, ao 3º dia de cultura do ensaio com ciclos dia-noite.

Em condições de iluminação contínua, a partir do 10º dia, quando a cultura já se encontrava em fase de morte (Figura 4.5 A), mas ainda em presença de nitratos,

observou-se um aumento significativo no teor de açúcares extraídos (26 % ao 19º dia), seguido de um período de estabilização de cerca de 30 dias, simultâneo com a depleção dos nitratos. Ao 53º dia de cultura, quando os nitratos se encontravam totalmente consumidos, foi possível uma extracção de 27 %.

Em presença de ciclos dia-noite, entre o 3º e o 7º dia foi visível um aumento do teor em açúcares (24 % ao 7º dia), simultâneo com a diminuição da concentração celular (Figuras 4.8 B e 4.12 B). A partir deste momento, a tendência foi para a diminuição dos açúcares, em paralelo com o consumo de nitratos. Ao 48º dia de cultura, o teor em açúcares era de apenas 12 %.

Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes aos descritos por Brányiková *et al.* (2011). Segundo estes autores, o teor final de açúcares nas células é influenciado essencialmente por dois factores: a intensidade de luz incidente, que determina a taxa de síntese do amido nos cloroplastos e a sua concentração final e, por outro lado, os processos consumidores de amido como fonte de energia, sobretudo a divisão celular.

Como foi visto na Figura 4.8 A, o crescimento da cultura de *Spirogyra* sp., em condições de iluminação contínua, apresentou apenas uma fase exponencial, ao passo que, sob a influência de ciclos dia-noite, se verificou a existência de duas. Assim sendo, e de acordo com o supramencionado, o desaparecimento de açúcares entre o início da cultura e o 5º ou 3º dia (e após o 27º dia na presença de ciclos dia-noite), poderá estar relacionado com o consumo do amido por parte da microalga, para manutenção do metabolismo celular, nomeadamente para assegurar os processos de divisão nuclear e celular.

Segundo Brányiková *et al.* (2011), uma maior intensidade de luz incidente proporciona maiores concentrações de amido armazenadas intracelularmente. Em ambos os ensaios, após a primeira fase exponencial ocorreu uma fase de morte em que se detectou aumento em açúcares, provavelmente porque com o decréscimo da concentração de biomassa a intensidade de luz incidente e disponível para cada célula era maior.

Consta de estudos como Maeda *et al.* (2006), Eriksen *et al.* (2007), Hu *et al.* (2008) e Griffiths e Harrison (2009), que o conteúdo de produtos de interesse (açúcar para bioetanol e lípidos para biodiesel) aumenta consideravelmente quando as células são expostas a condições de *stress*, nomeadamente esgotamento de nitratos. Todavia, neste estudo não foi possível verificar a resposta da espécie em relação à deficiência em fonte de azoto, pois o consumo de nitratos foi demasiado lento.

Para além da determinação do teor em açúcares totais realizou-se também a identificação e quantificação dos açúcares presentes no hidrolisado de microalga por HPLC, numa coluna Aminex HPX-87H. Estes hidrolisados apresentavam 2 picos com áreas significativas na zona de eluição de açúcares, correspondentes à celobiose ou maltose (dímeros de glucose; 9,7 min) e à glucose (10,7 min), e um 3º pico a 11,4 min que poderá corresponder a galactose, manose ou xilose. A separação efectiva dos picos não foi possível nesta coluna, pois estes compostos têm tempos de eluição demasiado próximos.

No entanto, as proporções relativas entre os picos encontrados indicavam sempre uma quantidade superior de glucose, nas formas monomérica e dimérica (Quadro 4.2), em relação aos restantes açúcares.

Quadro 4.2 – Valor médio das percentagens relativas obtidas para os açúcares quantificados por HPLC nos ensaios de crescimento de *Spirogyra* sp.

Açúcar	% do total de açúcares nos ensaios com ciclos dia-noite	% do total de açúcares nos ensaios com iluminação contínua
Glucose Total	69	59
Dímeros de Glucose	25	12
Monómeros de Glucose	44	47
Outros monómeros	31	41

Estes resultados vão de encontro ao esperado, uma vez que a parede celular da *Spirogyra* sp. é predominantemente constituída por celulose. Alguns autores presumem ainda a presença de maltose (Sulfahri, *et al.*, 2011), como resultado da degradação do amido produzido no cloroplasto e acumulado no interior da célula.

Nos hidrolisados analisados não foi detectada a presença de arabinose ($t_{\text{retenção}} = 12,5$ min), que poderia ser resultado da degradação da pectina da parede (secção 2.2.) já que a hidrólise ácida promove a libertação de açúcares neutros (Krall e McFeeters, 1998).

Além disso, está reportado por vários autores (Chandel *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2009; Gírio *et al.*, 2010) que, em condições fortemente acídicas, pode ocorrer decomposição dos monossacáridos em componentes indesejáveis (Figura 4.13) e hidrólise do grupo acetilo em ácido acético.

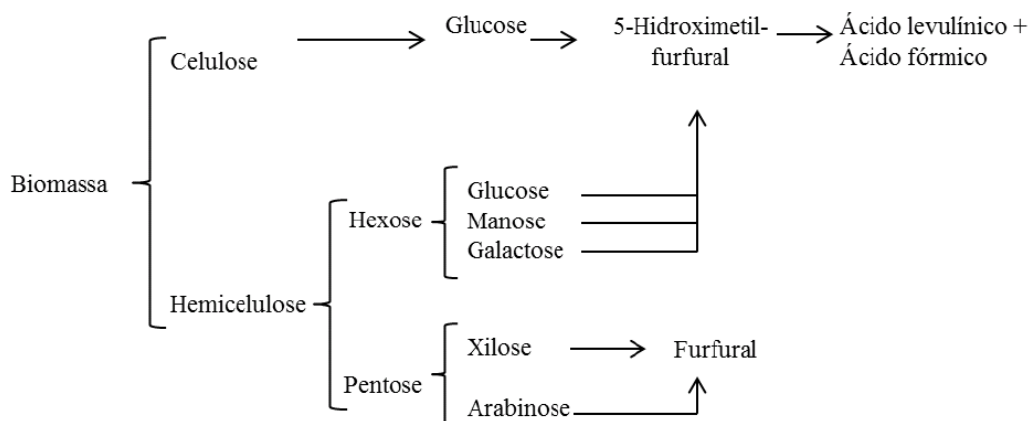


Figura 4.13 – Representação esquemática da degradação de açúcares em condições ácidas. Fonte: Adaptado de Girisuta *et al.* (2006).

Estes produtos podem também ser identificados na coluna de HPLC usada e foi o que realmente se observou, pois no hidrolisado de microalga detectou-se ainda a presença de produtos de degradação de açúcares, para além de ácidos orgânicos de cadeia curta provavelmente resultantes do metabolismo da alga e que foram libertados após a ruptura da parede (Figura 4.14).

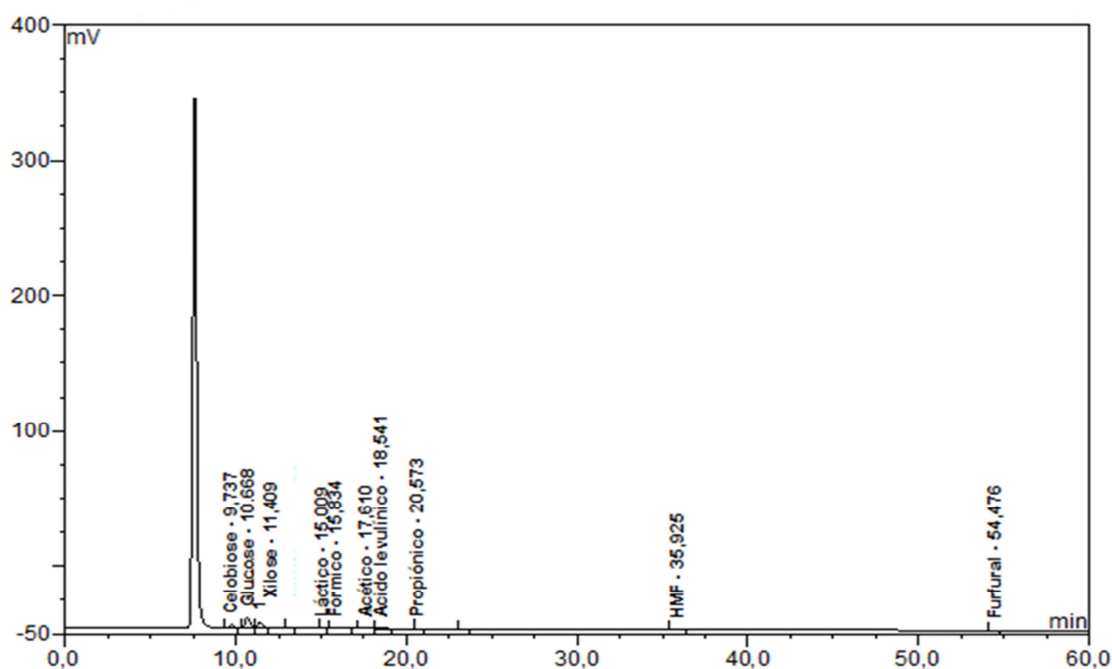


Figura 4.14 - Cromatograma de HPLC da análise de uma amostra de hidrolisado de *Spirogyra* sp. em ácido sulfúrico 2 N numa coluna Aminex HPX-87H.

Ao longo dos ensaios de crescimento, a tendência geral foi para a diminuição da concentração dos produtos, nomeadamente dos ácidos láctico e fórmico. Nos ensaios

com ciclo dia-noite esta tendência manteve-se para o ácido levulínico, contudo, nos ensaios com iluminação contínua, a concentração detectada por HPLC manteve-se constante ($0,27 \text{ \% g g biomassa}^{-1}$). Já a concentração em HMF, após um decréscimo inicial, observou-se um aumento concomitante com a redução do teor em ácidos fórmico e levulínico, que são os produtos da degradação deste composto. No caso dos ácidos acético e propiónico, o nível de concentração detectado por HPLC manteve-se constante ao longo dos dois ensaios de crescimento ($0,62$ e $0,16 \text{ \% g g biomassa}^{-1}$). A presença do furfural só foi detectada em algumas amostras, com um teor baixo a rondar os $0,06$ e $0,08 \text{ \% g g biomassa}^{-1}$ para os ensaios de iluminação contínua e com ciclos dia-noite, respectivamente (Figura 4.15), indicando alguma dificuldade na hidrólise da pectina.

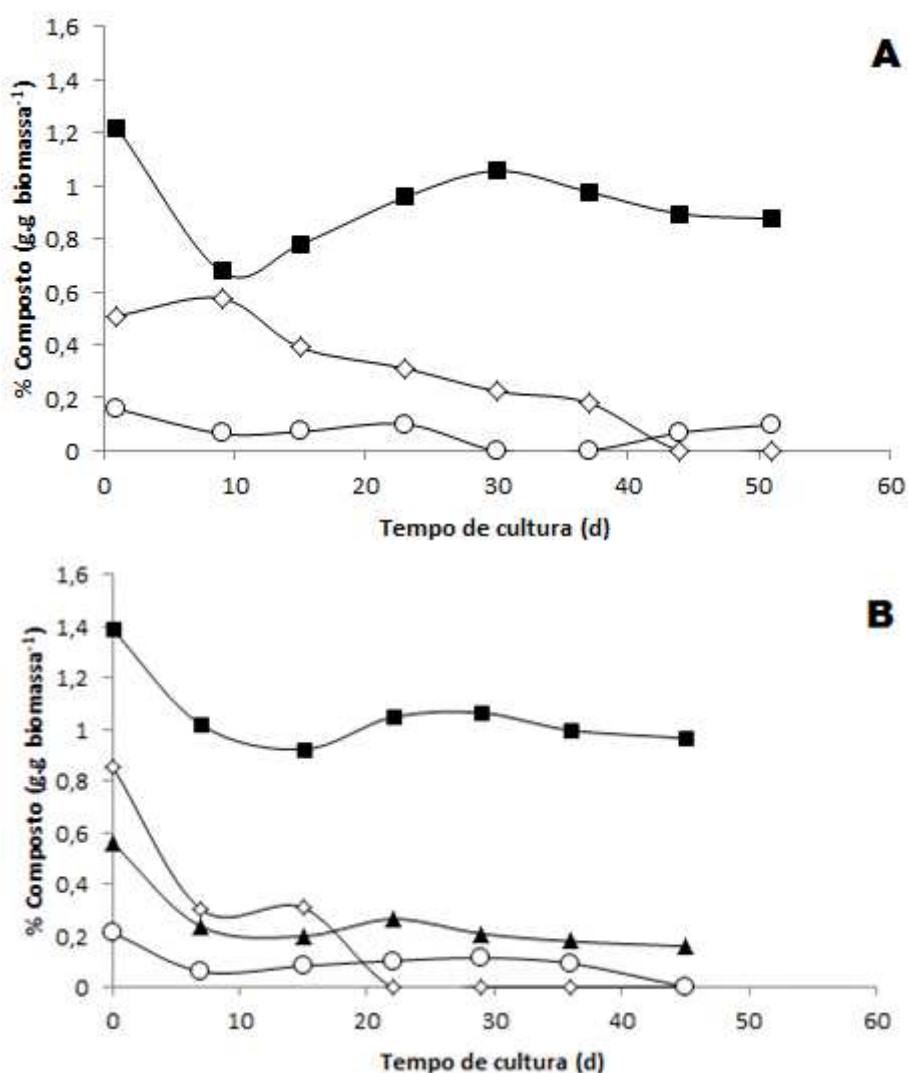


Figura 4.15 - Evolução da concentração de ácidos de cadeia curta e produtos derivados da degradação de açúcares ao longo do tempo de cultura sob iluminação contínua (A) e ciclos dia-noite (B): (ác. fórmico (■), ác. levulínico (▲), ác. láctico (◇) e HMF (○)).

Tal como se observou para o caso do teor em açúcares, também relativamente à concentração de HMF e ácidos láctico, fórmico e levulínico no hidrolisado a amostra inicial apresentou valores muito mais elevados, provavelmente devido a um diferente estado fisiológico das células provenientes do inóculo.

4.2. Selecção do Método de Ruptura da Microalga

As microalgas verdes (*Chlorophyta*), como a *Spirogyra* sp., acumulam açúcares intracelularmente sob a forma de amido (John *et al.*, 2011). Estes açúcares não são facilmente removidos, pois torna-se necessário romper a parede celular para os libertar. Assim sendo, a ruptura celular é uma etapa particularmente importante e o método mais apropriado um factor chave para a eficiência da extracção e, consequentemente para a produção de bioetanol.

Neste trabalho foram testados diferentes métodos para extrair açúcares da microalga *Spirogyra* sp., nomeadamente físicos, físico-químicos e físico-enzimáticos.

Usou-se a hidrólise ácida quantitativa (HAQ) como metodologia de referência que permite a extracção do teor máximo de açúcares (100 %) da biomassa de microalgas e, por comparação, todos os resultados obtidos são apresentados em percentagem de eficiência relativa. A HAQ é uma metodologia que permite determinar o teor total de açúcares numa amostra, garantindo a sua hidrólise total, incluindo a degradação da celulose presente na parede celular (Hoebler *et al.*, 1989). Dada a sua agressividade, é a metodologia geralmente adoptada para a caracterização de materiais lenhocelulósicos. A determinação da concentração de açúcares por HAQ foi realizada sempre que se mudou de lote de microalga.

4.2.1. Métodos Físicos

Os métodos físicos têm a vantagem de não necessitar de produtos químicos tóxicos, contudo são conhecidos por apresentarem consumos de energia elevados e taxas de hidrólise insuficientes (Molina-Grima *et al.*, 2003).

Os métodos físicos estudados revelaram-se pouco eficientes não atingindo níveis de extracção superiores a 25 %. O método que revelou ser o menos eficiente foi a desintegração com esferas de vidro, apresentando uma extracção de açúcares da ordem dos 8 % (HAQ - 38 % g eq_{glu}.g biomassa⁻¹). Com a destruição por microondas, foram obtidos valores de extracção de 10 % (Figura 4.16).

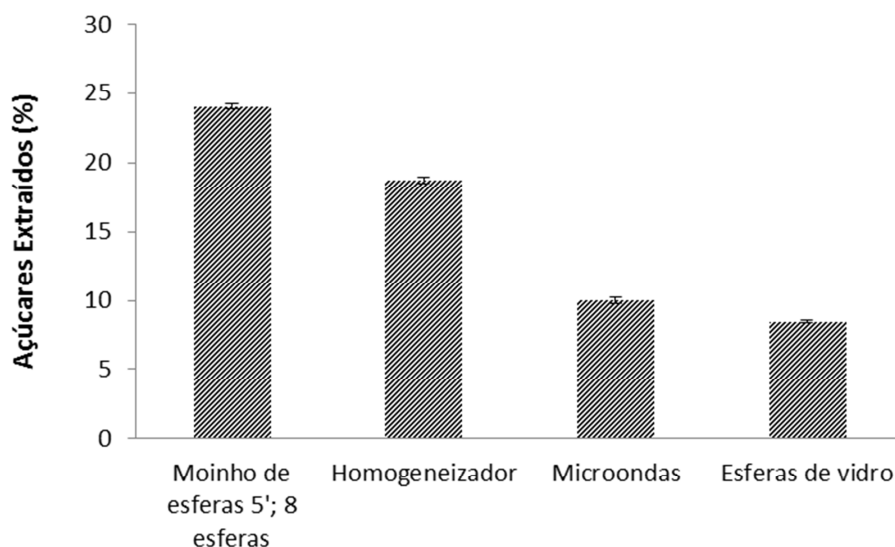


Figura 4.16 - Extracção de açúcares de biomassa seca de *Spirogyra* sp. por ruptura celular com diferentes métodos físicos. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.

Dos métodos físicos estudados, o moinho vibratório de esferas foi o mais eficiente corroborando com os resultados de Agbor *et al.* (2011) que refere que este método é mais eficaz do que a desintegração com esferas de vidro na quebra da celulose, elemento constituinte da parede celular da *Spirogyra* sp. (secção 2.2).

Tal como neste trabalho, também Lee *et al.* (2010) constataram, num estudo semelhante com outras microalgas, que a desintegração por microondas, um método, simples e de fácil execução, é mais eficiente do que a desintegração com esferas de vidro.

Com o moinho de esferas foi possível a extracção de 24 % dos açúcares disponíveis, em 5 min de moagem com 8 esferas de aço (HAQ – 26 % g eq_{glu}.g biomassa⁻¹). Neste sentido, foi decidida a realização de um estudo complementar, para optimização da eficiência da extracção com o tempo de moagem e o número de esferas.

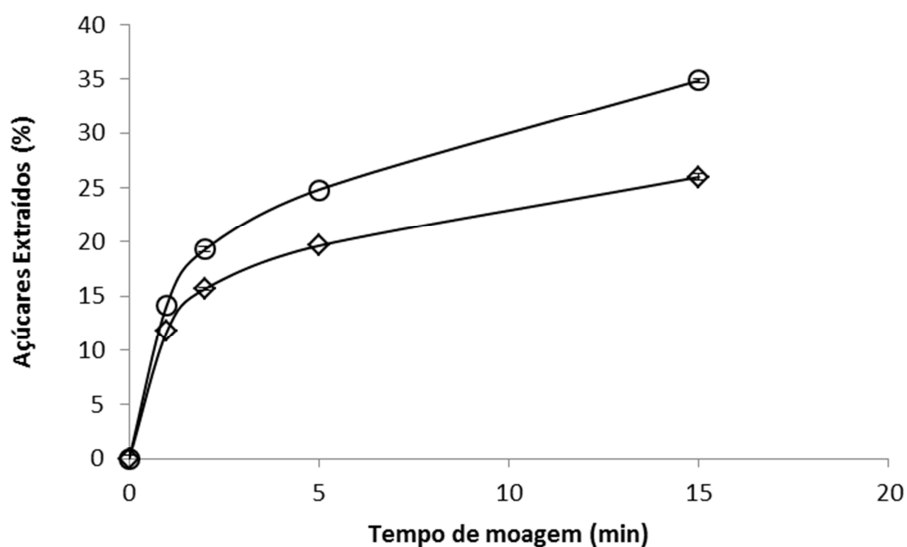


Figura 4.17 – Efeito do tempo na extração de açúcares de biomassa seca de *Spirogyra* sp., em moinho vibratório com 4 (◇) e 8 (○) esferas de aço de 8 mm. Os resultados representam a média de determinações, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.

O método do moinho de esferas mostrou ser mais eficiente na presença de maior número de esferas de aço, verificando-se um aumento da eficácia com o aumento do tempo de moagem (Figura 4.17), ou seja, o aumento no número de esferas em moagens de 2 min melhorou a extração em 3 pontos percentuais, enquanto a 15 min a utilização de 8 esferas produziu um aumento na extração de 9 pontos percentuais.

Para avaliar a eficiência da ruptura celular com este método, foi ainda realizada uma análise microscópica das células de microalgas antes e depois do pré-tratamento. A Figura 4.18 confirma a eficiência da moagem na ruptura celular, sendo visíveis em (A) as células antes do pré-tratamento com uma aparência esférica e a parede celular intacta e em (B) as células deterioradas após pré-tratamento de 15 min com 8 esferas de aço, em que foi possível obter extrações de açúcares na ordem dos 35 %.

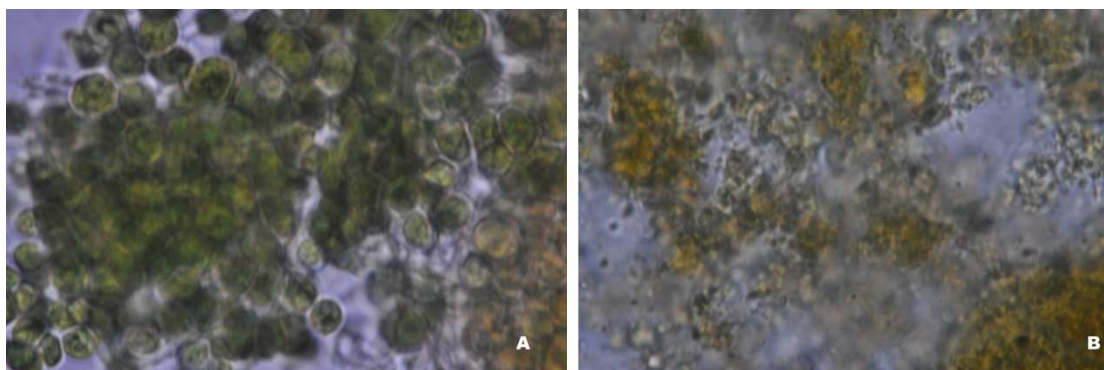


Figura 4.18 – Observação ao microscópio DM LB da Leica, numa ampliação x1000, de biomassa seca de *Spirogyra* sp. A – Células intactas sem sofrer tratamento, B – Células deterioradas após tratamento de 15 min com 8 esferas de aço.

A diferença de resultados entre os ensaios de 5 min com 8 esferas e 15 min com 4 esferas não é significativa, ou seja, com 8 esferas é possível obter idêntica percentagem de açúcares extraídos ($\approx 25\%$) num período de tempo três vezes menor e, portanto, com menor gasto energético. No entanto, o aumento do tempo de moagem com 8 esferas permite rendimentos de extracção bastante superiores (35 % a 15 min).

Para além da determinação do teor em açúcares totais libertados, recorreu-se ainda à análise por HPLC, numa coluna Aminex HPX-87H, para caracterizar os açúcares e detectar a presença eventual de outros tipos de produtos metabólicos no extracto obtido por acção dos diferentes métodos físicos testados (Figuras 4.19 e 4.20).

A hidrólise com métodos físicos permitiu a libertação de glucose sob a forma de mono e dissacárido, sendo a primeira forma a predominante. O método físico mais eficaz na extracção de açúcares (moagem em moinho de esferas; Figura 4.16), foi o único que permitiu a libertação de outros monossacáridos (galactose, manose ou xilose). Este resultado indicia que este foi o único método físico que teve capacidade de destruir o polímero de pectina.

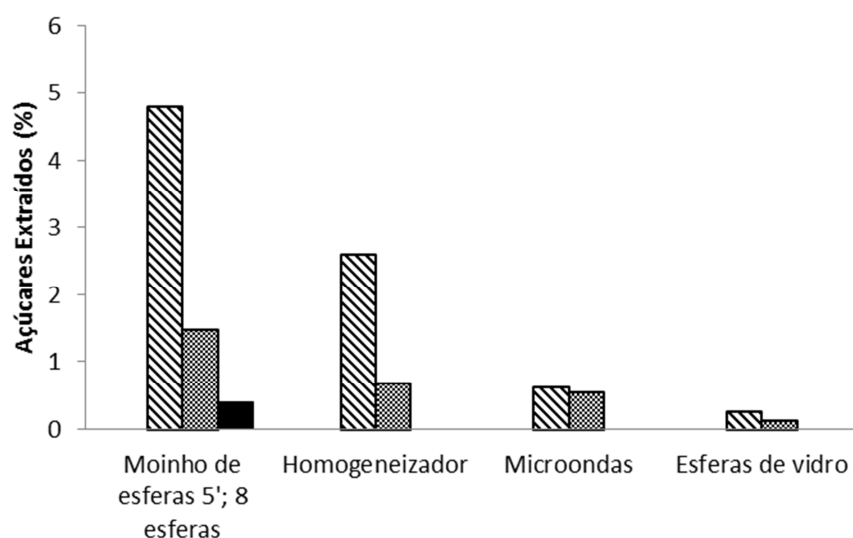


Figura 4.19 – Caracterização dos açúcares extraídos a partir de biomassa seca de *Spirogyra* sp. com diferentes métodos físicos (glucose (▨), dímeros de glucose (▩) e outros monossacáridos (■)).

Através da Figura 4.20, constata-se que todos os métodos físicos testados também provocaram a libertação de produtos metabólicos e da degradação de açúcares. O método mais eficiente na extracção de açúcares foi também o que levou ao aparecimento de maiores concentrações destes produtos, nomeadamente de ácido

acético. Verificou-se ainda que, apenas quando se usou moinho de esferas e homogeneizador, houve identificação da presença de furfural e HMF, produtos intermédios da degradação de açúcares. No entanto detectou-se em todos os casos a o aparecimento de ácido fórmico, provavelmente devido ao efeito de aumento de temperatura durante o processamento.

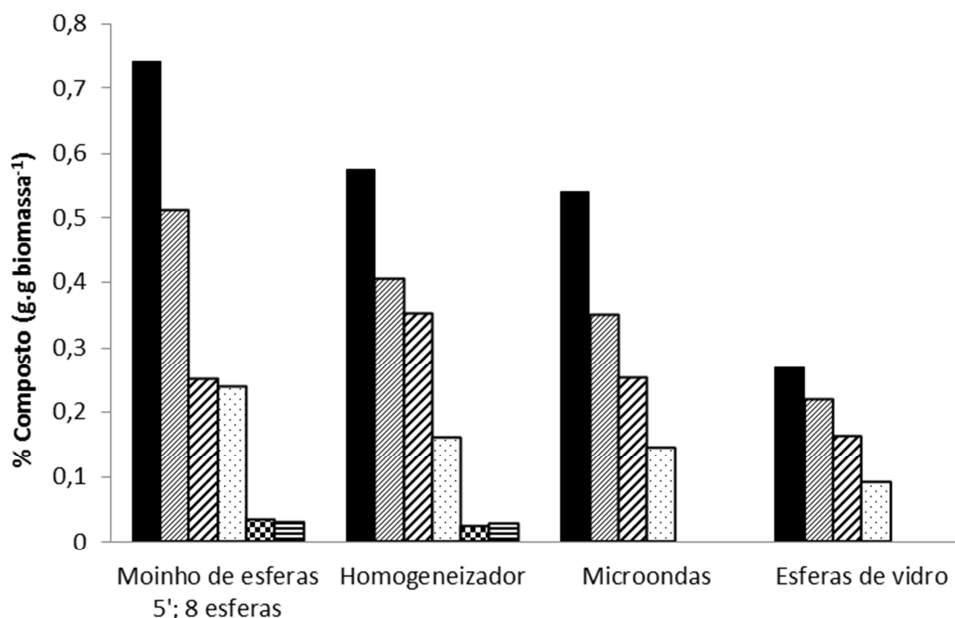


Figura 4.20 – Teor de produtos de degradação e ácidos de cadeia curta nos extractos de *Spirogyra* sp. por ruptura celular com diferentes métodos físicos (ác. acético – (■), ác. láctico (▨), ác. fórmico (▩), ác. propiónico (░), furfural (▣) e HMF (▤)).

Além disso, realizaram-se análises usando *kits* enzimáticos de determinação de amido para confirmar se era esta a forma em que se encontrava o açúcar produzido e armazenado intracelularmente, tal como referem os autores John *et al.* (2011) e Eshaqet *al.* (2011). Este estudo foi realizado apenas para os métodos que proporcionaram as melhores extracções de açúcares (moagem com moinho de esferas e homogeneizador) (Figura 4.21).

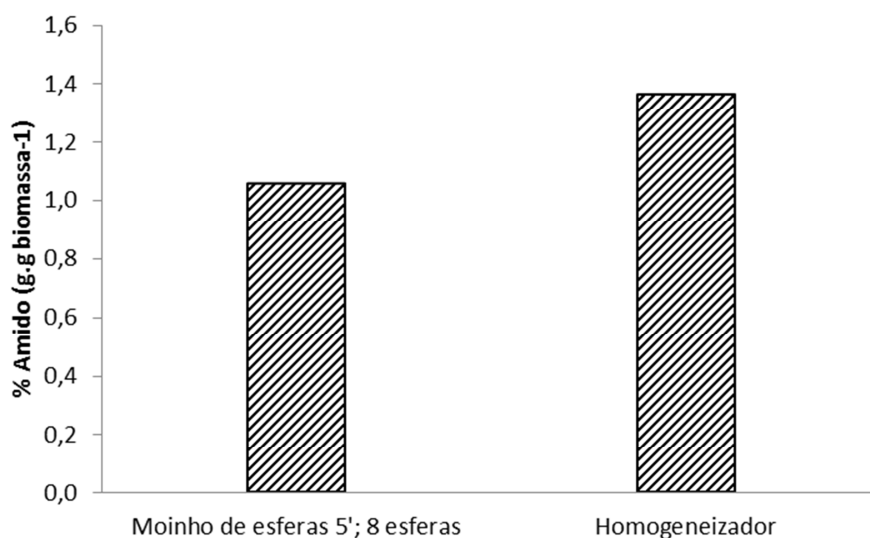


Figura 4.21 – Composição em amido nos extractos de *Spirogyra* sp. após ruptura das células com moinho de esferas durante 5'; 8 esferas e com homogeneizador.

Com este ensaio constatou-se a veracidade das afirmações de alguns autores, a *Spirogyra* sp. armazena açúcares sob a forma de amido. Sendo a moagem em moinho de esferas o método físico mais eficiente na ruptura da microalga é perceptível o porquê da percentagem de extracção de amido ser inferior à obtida por homogeneização: houve maior libertação de açúcares componentes da parede celular.

4.2.2. Métodos Físico-Químicos

Agentes químicos como ácidos, bases e solventes orgânicos têm sido descritos como responsáveis por um efeito significativo na hidrólise da estrutura nativa da biomassa microalgal. Contudo, o pré-tratamento com um agente ácido é o mais utilizado, pois permite maior eficácia na conversão de materiais celulósicos (Harun *et al.*, 2010b; Harun e Danquah, 2011a; Harun *et al.*, 2011).

Durante o processo de pré-tratamento com ácido são vários os parâmetros que influenciam significativamente a quantidade total de açúcares libertados - tempo de processo, temperatura e concentração do ácido são alguns deles (Harun e Danquah, 2011a). O tipo de ácido utilizado também é um factor determinante neste método e, por isso, foram já testados os ácidos clorídrico, sulfúrico e fosfórico (Agbor *et al.*, 2011). A hidrólise com agente ácido diluído já foi realizada sob as mais diversas condições, mas geralmente emprega uma concentração de ácido de 0,4 a 4 N, utilizando temperaturas moderadas (100-150 °C) (Gírio *et al.*, 2010). O ácido mais utilizado é o ácido sulfúrico, pois este apresenta a vantagem de o ião sulfato poder ser removido

por precipitação com compostos de reduzida toxicidade para as leveduras usadas posteriormente para a produção de bioetanol a partir dos açúcares das microalgas. É também mais vantajosa a sua utilização, uma vez que o ião sulfato é um nutriente que poderá estar presente no seu meio de cultura (Miranda, 2011).

Tendo em conta que cada microalga apresenta características únicas na sua parede celular, neste estudo, foi testada a eficiência do ácido sulfúrico e a influência da sua concentração na ruptura da parede celular da *Spirogyra* sp. Os ensaios foram realizados em autoclave durante 30 min, associando assim ao efeito do ácido, o efeito dos métodos físicos, temperatura e pressão (120 °C; 1,2 atm).

Na análise por FS, que permite determinar todos os tipos de açúcares (açúcares totais), os resultados mostraram que a concentração 0,4 N foi a que menos açúcares extraiu, provavelmente por esta concentração ser insuficiente para solubilizar e hidrolisar as fibras de celulose da parede celular. Com o aumento da concentração de ácido foi visível o incremento na quantidade de açúcares totais extraídos, até à concentração de 2 N, para a qual a extracção máxima de açúcares foi conseguida, com uma recuperação de cerca de 78 % (HAQ – 35 % g eq_{glu}·g biomassa⁻¹) (Figura 4.22). Estes valores estão de acordo com o previsto, dado que Harun *et al.* (2010b) descreve rendimentos entre 70 a 95 % em pré-tratamentos com ácido diluído, o que demonstra o forte potencial deste método como pré-tratamento para a biomassa microalgal, anteriormente confirmado por Nguyen *et al.*, 2009.

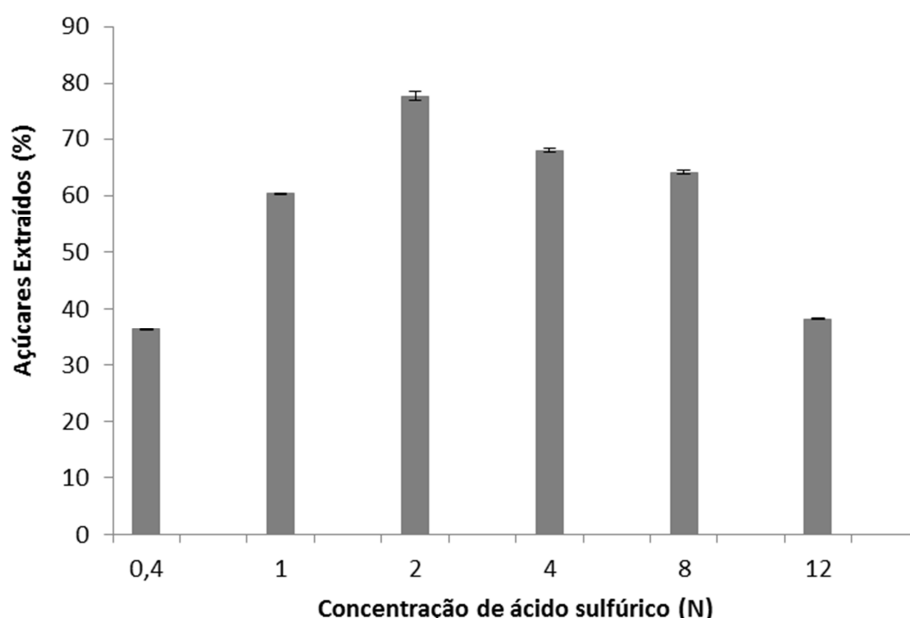


Figura 4.22 – Extracção de açúcares a partir de biomassa seca de *Spirogyra* sp. com diferentes concentrações de ácido sulfúrico. Os resultados representam a média de ensaios, em duplicado, e o respectivo desvio padrão.

Analisando também os extractos por HPLC, constatou-se que, tal como já observado nos crescimentos em manga, os açúcares foram libertados principalmente na forma de monómeros de glucose (Figura 4.23). A concentração de 0,4 N foi excepção e o motivo será o referido anteriormente, na análise por FS.

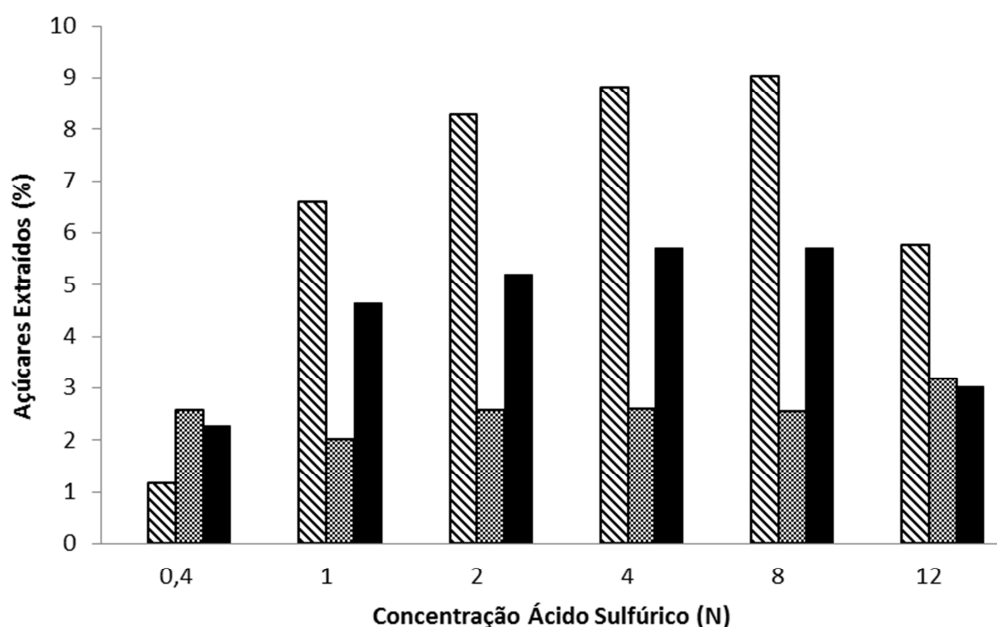


Figura 4.23 – Caracterização dos açúcares extraídos a partir de biomassa seca de *Spirogyra* sp. com diferentes concentrações de ácido sulfúrico (glucose (▨), dímeros de glucose (▩) e outros monossacáridos (■)).

O aumento da concentração para valores de 4, 8 e 12 N não apresentou vantagens, pelo contrário, teve como consequência directa um decréscimo no teor em açúcares totais (Figura 4.22). Estes resultados vão ao encontro com o reportado por vários autores (Chandel *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2009; Gírio *et al.*, 2010), de que em condições fortemente acídicas pode ocorrer decomposição dos monossacáridos em componentes indesejáveis (Figura 4.13) e hidrólise do grupo acetilo em ácido acético, nomeadamente na presença de temperaturas ou concentrações elevadas.

A Figura 4.24 demonstra o aparecimento de produtos de degradação aquando da aplicação do pré-tratamento com ácido e, é ainda perceptível que, as concentrações mais elevadas de ácido estão associadas a um aumento dos teores em ácido fórmico e levulínico, em detrimento da detecção de 5-hidroximetilfurfural (HMF), pois é este o produto que em condições extremas origina os dois ácidos (Figura 4.13). Foi ainda detectada a presença de ácidos orgânicos de cadeia curta (propiónico e láctico), possíveis intervenientes das vias metabólicas da microalga. Todos estes compostos já

foram referenciados como podendo exercer efeitos nocivos na capacidade fermentativa das leveduras (Chandel *et al.*, 2007).

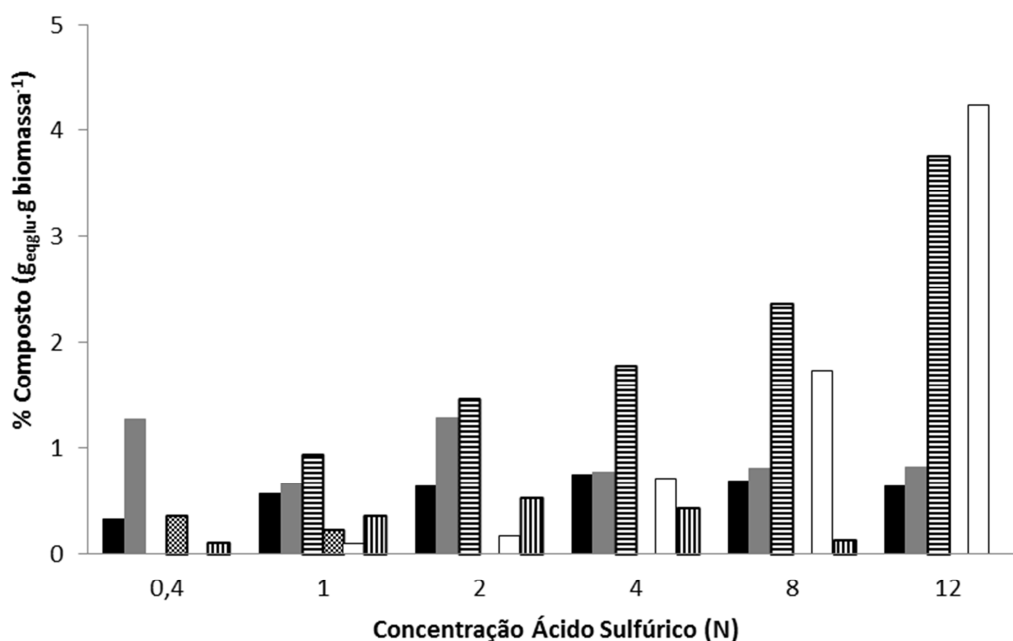


Figura 4.24 – Teor de produtos de degradação e ácidos voláteis nos extractos de *Spirogyra* sp. em função da concentração de ácido sulfúrico usada na extração (ác. acético – (■), ác. láctico (■), ác. fórmico (▨), ác. propiónico (▣), ác. levulínico (□) e HMF (▤)).

Estes resultados reforçam a ideia de que a concentração ideal de ácido para o pré-tratamento da biomassa de *Spirogyra* sp. é a de 2 N, na medida em que permite uma extração de açúcares bastante satisfatória em paralelo com uma reduzida degradação de açúcares. Este resultado confirma trabalhos anteriores com outras microalgas para a produção de bioetanol, nomeadamente Nguyen *et al.*, (2009) com a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* e Miranda (2011) com *Scenedesmus obliquus*.

4.2.3. Métodos Físico-Enzimáticos

As enzimas são moléculas biológicas de origem proteica e de acção específica que actuam na degradação de compostos orgânicos, nomeadamente proteínas, lípidos e polissacáridos, libertando para o meio extracelular moléculas de menores dimensões e mais disponíveis para os microrganismos, tais como aminoácidos, ácidos gordos e açúcares (Alberts *et al.*, 1989).

O processo de hidrólise é susceptível de ser influenciado por diversos factores, incluindo a área de contacto com o substrato, a resistência da parede celular, a porosidade, fenómenos de transferência de massa e também pelas características intrínsecas à própria enzima - tipo de enzima, pH óptimo e temperatura óptima (Harun e Danquah, 2011b).

Por isso, para aumentar a área de superfície específica disponível, reduzir o grau de polimerização e romper a parede celular, realizou-se um passo prévio de moagem de 2 g de microalga seca em moinho vibratório durante 5 min com 4 esferas de aço.

Uma vez que a parede celular da *Spirogyra* sp. contém pectina e celulose como constituintes predominantes, foram utilizadas 3 formulações enzimáticas comerciais passíveis de hidrólise da biomassa: Viscozyme L, Carezyme 1000L e Hemicelulase.

O objectivo deste estudo foi encontrar o tipo de enzima adequado para promover a hidrólise da biomassa, estudando também o efeito da concentração de substrato.

Os ensaios foram realizados a pH 5,5 e à temperatura óptima para cada formulação: 40, 60 e 70 °C respectivamente para a Viscozyme L, Carezyme 1000L e Hemicelulase (secção 3.5.6.). Por isso, para além dos ensaios enzimáticos realizaram-se paralelamente ensaios em branco com 0,2 g de biomassa seca, mas sem enzima para avaliar o mero efeito da temperatura na libertação de açúcares pelas células moídas e, nos valores da concentração de açúcares em solução que são apresentados realizou-se uma correcção relativamente à quantidade de açúcares existentes na solução original de enzima.

Os resultados mostram que o efeito da temperatura, por si só, contribuiu para a libertação de açúcares da biomassa moída (Figura 4.25). O aumento da temperatura da reacção de 40 para 60 °C levou a que a extracção fosse mais rápida, embora se tenha atingido o mesmo nível ao fim de 72 h de ensaio. Em ambos os casos entre as 5 e as 72 h verificou-se que o teor em açúcares libertados aumentou cerca de 13 pontos percentuais. Todavia, o aumento da temperatura de 60 para 70 °C fez com que a percentagem de açúcares detectados no extracto fosse menor, o que poderá indiciar a degradação dos mesmos.

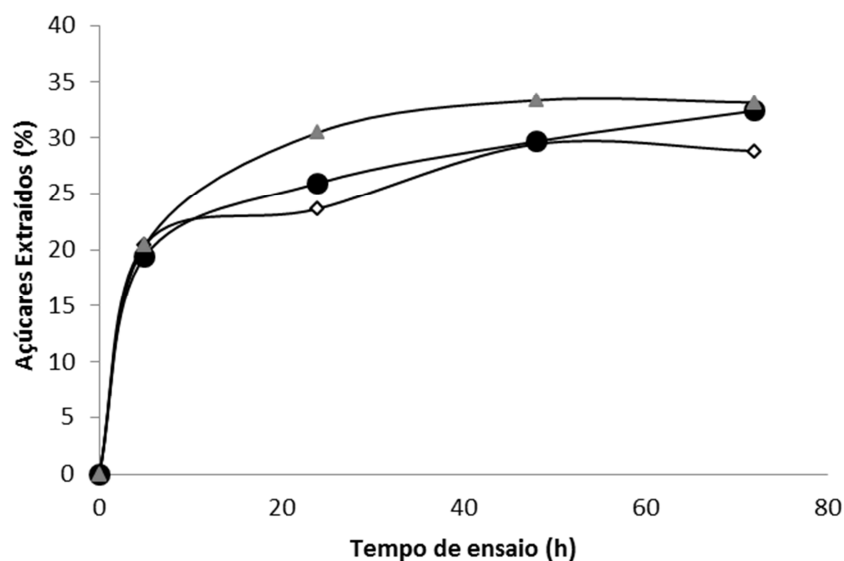


Figura 4.25 – Efeito da temperatura na extração de açúcares de biomassa seca e moída de *Spirogyra* sp. com água - 70 °C (◇), 60 °C (▲) e 40 °C (●) - em 0,2 g de biomassa seca de *Spirogyra* sp.

A única formulação enzimática eficaz foi a Viscozyme L (Figura 4.26), tendo sido atingidos níveis de extração de 90 % e 55 % (HAQ - 26 % g eq_{glu}.g biomassa⁻¹) na hidrólise de 0,2 g e 2 g de microalga respectivamente, um aumento em 60 % relativamente à extração sem enzima. Estes resultados estão de acordo com o expectável, pois esta formulação inclui na sua constituição enzimas de *Aspergillus* sp. como arabanases, β-glucanases e xilanases, para além de celulase, enzima que constitui a Carezyme 1000L e, de hemicelulase. A celulase e as β-glucanases são responsáveis pela redução da celulose em açúcares simples - glucose. Todavia, estas enzimas são altamente específicas, isto é, afectam apenas a celulose, ficando a hemicelulose contida na biomassa intacta (Harun *et al.*, 2010b), e daí a importância das restantes enzimas na formulação. A pectina, similar à hemicelulose, é um polímero ramificado e heterogéneo de pentoses e hexoses, que necessita de enzimas como as xilanases e as arabanases para a quebra das ligações quer da cadeia principal, quer das ramificações.

Estes resultados corroboram Alvira *et al.* (2010) que descrevem que complexos enzimáticos contribuem eficazmente para a degradação da estrutura complexa da celulose e da pectina, permitindo maiores rendimentos em açúcares.

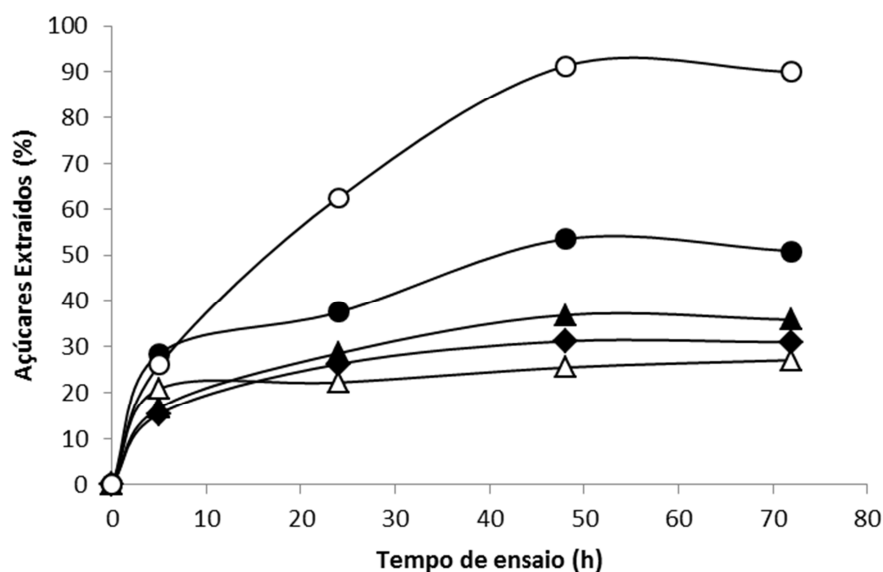


Figura 4.26 – Eficiência da hidrólise enzimática na extração de açúcares a partir de 0,2 g (símbolos abertos) e 2 g (símbolos fechados) de biomassa moída de *Spirogyra sp.* – Hemicelulase (◆;◇), Viscozyme L (●; ○) e Carezyme 1000L (▲;△).

O nível máximo de extração ocorreu, em todos os casos, ao fim de 48 h, mas o efeito da Carezyme 1000L e da Hemicelulase foi praticamente nulo já que em presença de enzima se atingiu um nível similar ao obtido com a suspensão da alga em solução tampão (Figuras 4.25 e 4.26). Deste modo, o ligeiro aumento observado ao aumentar a concentração de biomassa (2-3 %) deverá corresponder apenas ao aumento que seria de esperar pela difusão dos açúcares para a solução tampão, a partir de uma quantidade mais elevada de biomassa moída.

Apesar dos resultados favoráveis ($\approx 90\%$ de extração), a degradação enzimática não foi o método escolhido para os ensaios de extração de açúcares da biomassa de *Spirogyra sp.*, pois o processo seria demasiado moroso (48 h), e com concentrações de biomassa tão baixas ($0,2\text{ g em } 50\text{ mL} = 4\text{ gL}^{-1}$), a concentração de açúcares no extracto seria também demasiado baixa para viabilizar a produção de etanol. Para além disso, as enzimas são particularmente caras, devido à sua forma de produção e do facto de normalmente não poderem ser recuperados e/ou reciclados após a utilização (Sander e Murthy, 2009).

A selecção do método de extração a usar com a microalga *Spirogyra sp.* recaiu então sobre os métodos físico-químicos, mais concretamente, a hidrólise em autoclave na presença de ácido sulfúrico 2 N, onde foram atingidos valores de extração de 78 % e onde se constatou uma baixa presença de produtos de degradação. Além disso, é um

processo em que o aumento da quantidade de biomassa permite obter concentrações elevadas de açúcares no extracto (Miranda, 2011). Também Harun e Danquah (2011a) defenderam a aplicação destes métodos, mencionando que o pré-tratamento com ácido é a melhor opção, nomeadamente em termos de consumo energético.

4.3. Selecção de Leveduras para a Fermentação Alcoólica de Extracto de Microalga

Tal como previsto, a análise por HPLC da composição em açúcares do hidrolisado de *Spirogyra* sp. (secção 4.1.4.) indicou a presença de açúcares monoméricos, que poderão ser provavelmente galactose e/ou manose (hexoses) e/ou xilose (pentose), e, como açúcar predominante, a glucose. De acordo com o referido na secção 2.4.2., a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, usualmente utilizada no processo fermentativo, não é um microrganismo promissor na fermentação de pentoses. Posto isto, houve a necessidade de averiguar o desempenho de outras leveduras, de modo a seleccionar a mais adequada para a função.

4.3.1. Crescimento de Inóculos

O estudo iniciou-se com a avaliação da capacidade de crescimento de inóculos de sete estirpes de levedura – *S. cerevisiae* DER 24, *S. cerevisiae* COM 1890, *S. carlsbergensis* ATCC 6269, *K. marxianus* PYCC 2671, *K. thermotolerans* PYCC 2908, *P. stipitis* CBS 181 F e *T. delbrueckii* PYCC 4487.

Os ensaios decorreram de acordo com o descrito na secção 3.6.1. e, constatou-se que, regra geral, as leveduras se encontraram durante 8 horas em fase de crescimento exponencial (entre as 6 e as 14 h após a inoculação). São excepção a *P. stipitis*, cuja fase exponencial se prolonga por 12 horas (5-17 h após a inoculação) e a *K. thermotolerans*, com uma fase exponencial de apenas 5 horas (10 -15 h após inoculação) (Figura 4.27).

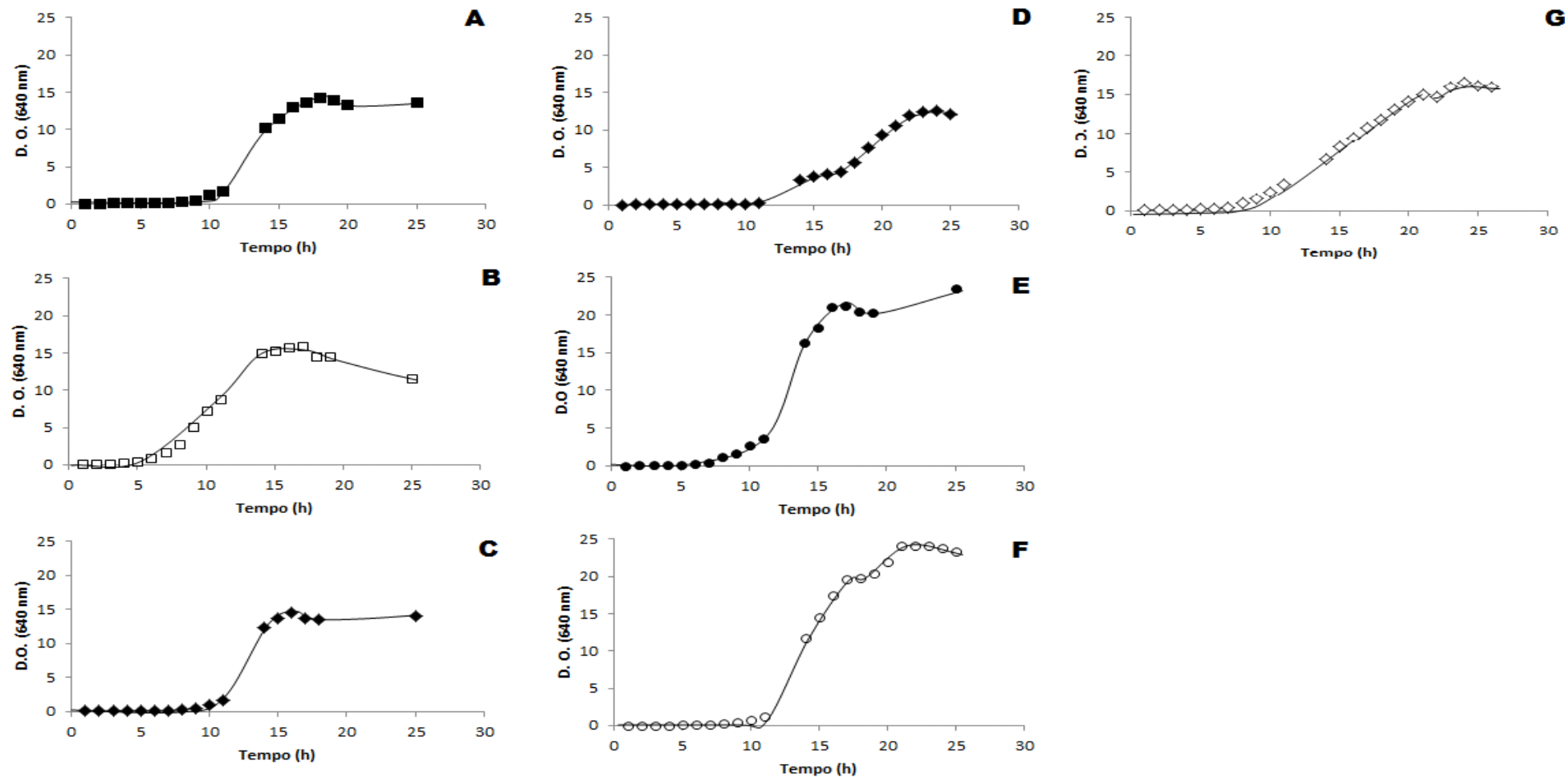


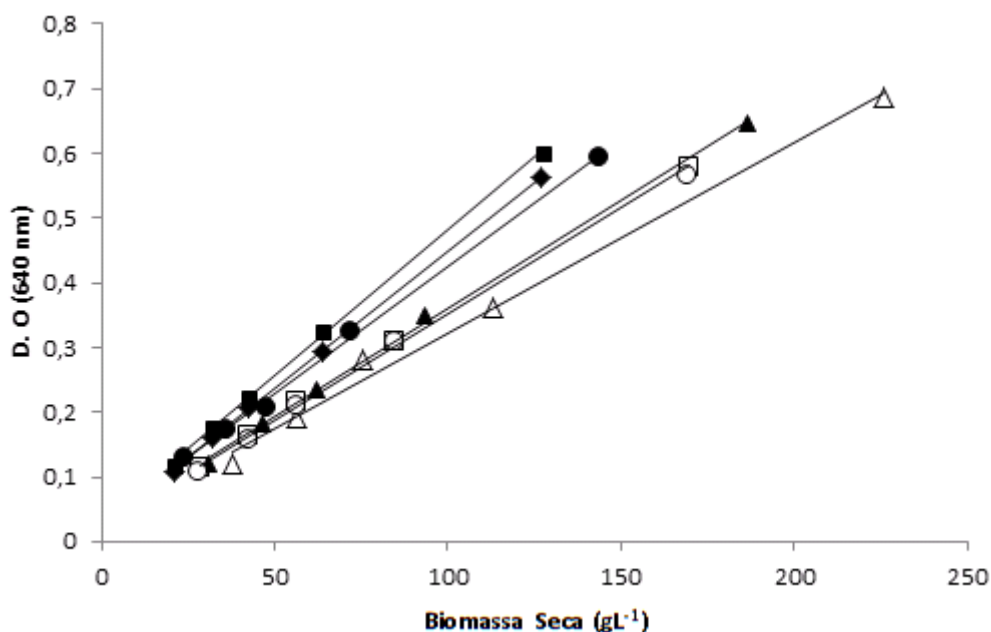
Figura 4.27 - Curvas de crescimento de *S. cerevisiae* DER 24 (A), *S. cerevisiae* COM 1890 (B), *S. carlsbergensis* ATCC 6269 (C), *K. thermotolerans* PYCC 2908 (D), *K. marxianus* PYCC 2671 (E), *T. delbrueckii* PYCC 4487 (F) e *P. stipitis* CBS 181 F (G) em meio MC com 50 gL⁻¹ de glucose (incubação a T=30 °C e 150 rpm).

Com este ensaio apurou-se ainda que *K. marxianus* e *T. delbrueckii* foram as leveduras mais eficientes, atingindo concentrações de biomassa mais elevadas. Todavia, as leveduras *S. cerevisiae* COM 1890 e *S. carlsbergensis* ATCC 6269 foram as que apresentaram maiores taxas específicas de crescimento. *K. thermotolerans* foi a levedura que menos se destacou apresentando uma taxa específica de crescimento e uma produção de biomassa inferiores (Quadro 4.3).

Quadro 4.3 - Taxa específica de crescimento e concentração máxima de biomassa produzida para as leveduras estudadas em pré-culturas com 50 gL⁻¹ de glucose (T = 30 °C; 150rpm).

Levedura	μ (h ⁻¹)	Biomassa máx. (gL ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i> DER 24	0,566	3,93
<i>S. cerevisiae</i> COM 1890	0,593	4,98
<i>S. carlsbergensis</i> ATCC 6269	0,595	3,91
<i>K. marxianus</i> PYCC 2671	0,554	5,07
<i>K. thermotolerans</i> PYCC 2908	0,354	2,47
<i>P. stipitis</i> CBS 181 F	0,406	4,77
<i>T. delbrueckii</i> PYCC 4487	0,514	5,37

Para que fosse possível a quantificação da biomassa produzida, foram construídas rectas padrão que relacionam a DO_{640nm} com a concentração de biomassa seca de cada uma das culturas (Figura 4.28). Constatou-se que as leveduras pertencentes ao mesmo género apresentam grandes semelhanças nas relações entre a DO_{640 nm} e a biomassa seca. Para um mesmo valor de densidade óptica de uma suspensão celular, o género *Saccharomyces*, onde se destaca sobretudo a *S. cerevisiae* COM 1890, apresentou maiores concentrações de biomassa (declives menores) e, o género *Kluyveromyces* exibiu menores concentrações (declives maiores). A levedura *T. delbrueckii* apresentou um comportamento semelhante às leveduras do género *Kluyveromyces*, enquanto a *P. stipitis* se assemelhou mais ao género *Saccharomyces*.



Microrganismo	Declive da Recta	Ordenada na Origem	R ²
<i>S. cerevisiae</i> DER 24	0,0033	0,0256	0,9994
<i>S. cerevisiae</i> COM 1890	0,0029	0,0293	0,9929
<i>S. carlsbergensis</i> ATCC 6269	0,0034	0,0239	0,9987
<i>K. marxianus</i> PYCC 2671	0,0039	0,0305	0,9982
<i>K. thermotolerans</i> PYCC 2908	0,0045	0,0294	0,9990
<i>P. stipitis</i> CBS 181 F	0,0032	0,0244	0,9982
<i>T. delbrueckii</i> PYCC 4487	0,0043	0,0221	0,9997

Figura 4.28 - Relação entre a DO_{640 nm} e a biomassa seca das culturas de *T. delbrueckii* (◆), *K. thermotolerans* (■), *S. cerevisiae* COM 1890 (Δ), *S. cerevisiae* DER 24 (□), *S. carlsbergensis* (▲), *K. marxianus* (●) e *P. stipitis* (○) em meio MC com 50 gL⁻¹ de glucose (incubação a T = 30 °C e 150 rpm).

Tendo em conta os resultados obtidos, foi decidido que nos ensaios de fermentação alcoólica em meio sintético seriam utilizadas as leveduras *S. carlsbergensis* ATCC 6269 e *T. delbrueckii* PYCC 4487, por apresentarem a maior taxa específica de crescimento e a maior produção de biomassa, respectivamente, tendo em vista a obtenção de bons inóculos para a produção de bioetanol.

4.3.2. Fermentação Alcoólica em Meio Sintético

Os ensaios de fermentação foram realizados em meio MC com 50 gL⁻¹ de diferentes fontes de carbono (xilose, glucose, arabinose, manose e galactose), que se pensa poderem existir em extractos de alga (Figuras 4.29 e 4.30; Quadro 4.4), inoculado com 150 mgL⁻¹ de levedura.

Quadro 4.4 - Valores finais para fermentações em meio MC com 50 gL⁻¹ de açúcar (GL – glucose; M – manose; GA – galactose; X – xilose; A – arabinose; EtOH – etanol).

Levedura	Fonte de C	Tempo de fermentação (h)	Concentração máxima de biomassa (gL ⁻¹)	Açúcar consumido (gL ⁻¹)	EtOH máximo (gL ⁻¹)	Y (g EtOH.g açúcar ⁻¹)
<i>S. carlsbergensis</i> ATCC 6269	GL	22	4,27	49,6	20,9	0,421
	A	73	1,00	4,30	0,03	0,006
	X	54	1,05	0	0	-
	GA	24	0,79	0	0	-
	M	22	4,80	49,8	20,8	0,418
<i>T. delbrueckii</i> PYCC 4487	GL	23	4,98	54,1	18,1	0,334
	A	73	0,63	5,30	0,07	0,013
	X	192	0,53	0	0	-
	GA	192	0,65	0	0	-
	M	23	4,91	52,1	18,9	0,362

Ambas as leveduras conseguem metabolizar glucose, maltose e alguma arabinose ($\approx 5 \text{ gL}^{-1}$) não apresentando capacidade para degradar xilose e galactose. A levedura *T. delbrueckii* apresentou também neste ensaio, a maior produção de biomassa em meio sintético contendo 50 gL⁻¹ de glucose e consequentemente um menor rendimento em etanol.

Tendo em conta a equação 1 (secção 2.4.), o rendimento máximo teórico ($Y_{\text{máx}}$) resultante do processo de fermentação de hexoses é 0,511 g EtOH.g⁻¹ açúcar, dado

que se produzem 2 mol de etanol por mol de glucose. A levedura *S. carlsbergensis* foi a que apresentou maiores rendimentos em etanol (82 % do valor de $Y_{\text{máx}}$).

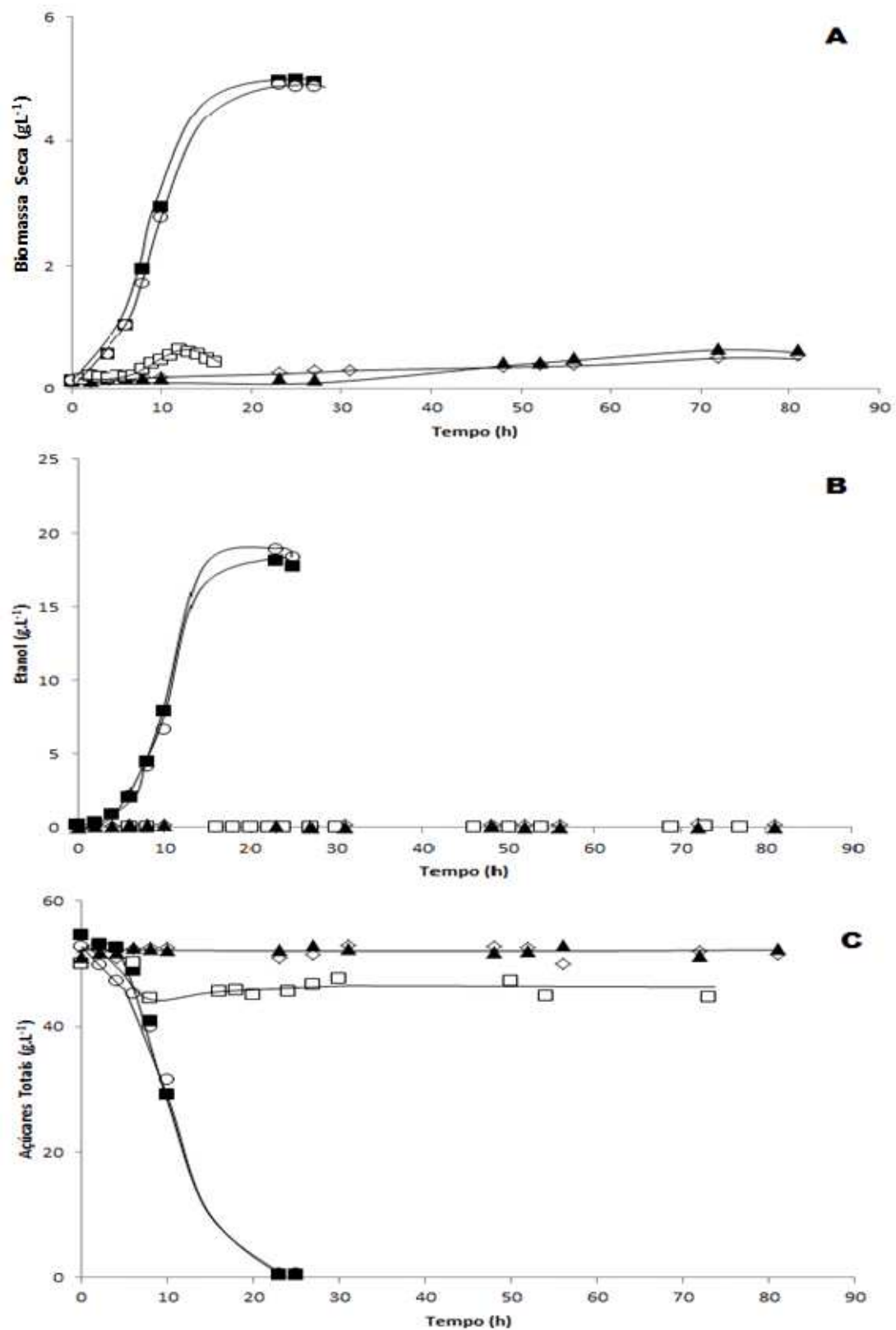


Figura 4.29 – Crescimento (A), produção de etanol (B) e consumo de açúcares (C) em culturas de *T. delbrueckii* em meio MC com 50 g L^{-1} de xilose (\diamond), glucose (\blacksquare), galactose (\blacktriangle), manose (\circ) e arabinose (\square) ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 150 rpm).

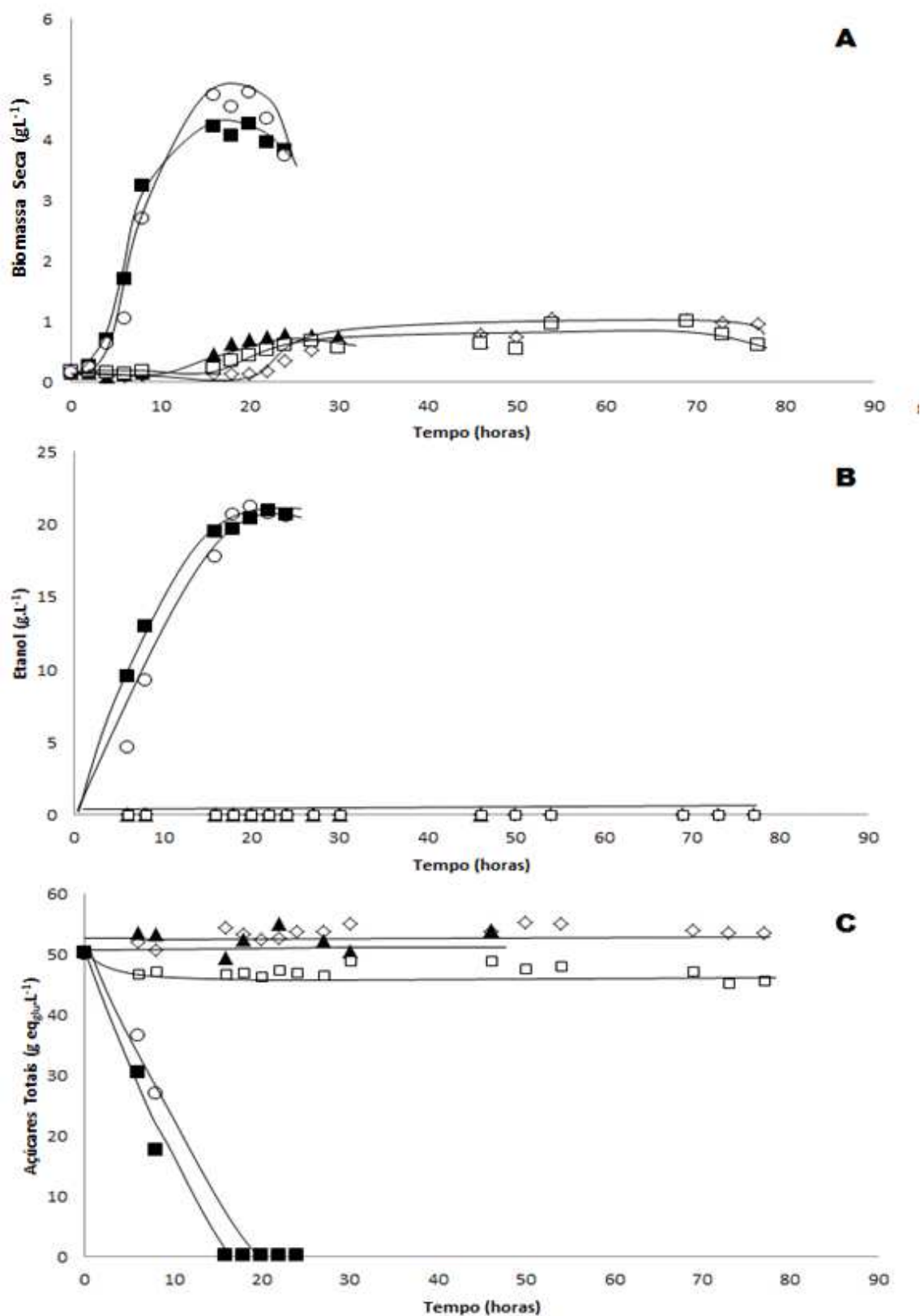


Figura 4.30 – Crescimento (A), produção de etanol (B) e consumo de açúcares (C) em culturas de *S. carlsbergensis* em meio MC com 50 g L^{-1} de xilose (◇), glucose (■), galactose (□), manose (○) e arabinose (◻) ($T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 150 rpm).

Com base neste estudo, a levedura mais promissora para os ensaios de fermentação de hidrolisados da microalga *Spirogyra* sp. seria a *S. carlsbergensis*.

Ainda assim, os rendimentos obtidos com estas leveduras encontram-se abaixo dos descritos por Sulfahri *et al.* (2010) para a levedura *S. cerevisiae* ($\approx 90\%$ em glucose) que é a tradicionalmente utilizada em processos industriais. Esta levedura para além de apresentar rendimentos elevados, tem ainda como vantagens o facto de produzir etanol sem gerar outros subprodutos e a sua superioridade em fermentar hidrolisados não destoxificados, resultantes do pré-tratamento de biomassa lenhocelulósica (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007).

Em linhas gerais, será ainda necessário continuar a busca por uma levedura que utilize ambos os tipos de açúcares, pentoses e hexoses, para a produção de etanol, com altos rendimentos. A engenharia genética tem desempenhado um papel fundamental neste sentido, na medida em que muitos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de expressar genes, presentes noutros organismos, na *S. cerevisiae* para que esta possa ultrapassar as suas lacunas no processo fermentativo e tornar-se o microrganismo ideal para a produção de bioetanol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

As microalgas representam um dos mais eficientes sistemas biológicos de transformação de energia solar em compostos orgânicos, através da fotossíntese. Por apresentarem uma distribuição ubíqua global, poderem ser cultivadas nos mais inóspitos locais, tais como lagos salinos adjacentes a desertos, e produzirem hidrocarbonetos, lípidos e/ou açúcares, são uma boa alternativa como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, pela não competição com as culturas alimentares.

Este trabalho teve como objectivo estudar a viabilidade de utilização da microalga *Spirogyra* sp. como matéria-prima para a produção de bioetanol, e iniciou-se com a realização de culturas sob diferentes regimes de iluminação. Os resultados obtidos mostraram que a produção de biomassa é mais eficiente na presença de iluminação constante ($\mu = 0,13 \text{ d}^{-1}$), tendo sido atingida a concentração de $0,29 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}$ em 5 d. Todavia, com ciclos dia-noite (14 h/10 h) atingiu-se uma concentração máxima de microalga de $0,34 \pm 0,05 \text{ gL}^{-1}$ em 41 d.

Relativamente à acumulação de açúcares o valor máximo (26 % g eq_{glu} g biomassa⁻¹ em 19 d) ocorreu mediante iluminação contínua, condição que se verificou ocorrer paralelamente com o consumo de nitratos pela microalga. Todavia, a acumulação de açúcares é mais eficiente na presença de ciclos (19 vs. 12 % em 5 d), o que se traduz numa concentração de 39 e 35 mgL⁻¹, respectivamente. A mistura de açúcares extraída de *Spirogyra* sp. era maioritariamente composta por glucose, derivada provavelmente do amido produzido pela alga e da celulose e pectina que compõem a parede celular. Tendo em conta que o objectivo final é rentabilizar a produção de etanol, as condições ideais de desenvolvimento desta microalga serão na presença de iluminação contínua.

Algumas dificuldades surgidas ao longo deste trabalho revelaram que o meio usado para a *Spirogyra* sp, é propício ao desenvolvimento de vários microrganismos e que, quando contamina, esta microalga não tem capacidade de crescimento para se sobrepor à contaminação. Este será um factor que terá de ser ponderado na definição do tipo de reactor a usar para a realização de um *scale-up* do processo, já que normalmente se utilizam *raceway ponds*, que são sistemas abertos e, portanto, mais vulneráveis à contaminação.

Para a ruptura celular e extracção dos açúcares desta alga, testaram-se vários métodos, dos quais o mais eficiente foi a associação de moagem com hidrólise enzimática, usando uma mistura comercialmente designada por Viscozyme L, que permitiu atingir 90 % de extracção. Contudo, tendo em conta o tempo que leva o

processo (> 48 h), considerou-se neste trabalho mais adequada, para a ruptura da parede celular da *Spirogyra* sp., a utilização de hidrólise em presença de ácido sulfúrico 2 N em autoclave (120 °C; 30 min; 1,2 atm), que permitiu a recuperação de cerca de 78 % dos açúcares, sem que se detectasse uma elevada formação de produtos da degradação. Métodos físicos, tais como moagem homogeneização, microondas e desintegração por esferas de vidro, por si só revelaram-se menos eficientes, permitindo obter apenas 25 % dos açúcares extractáveis.

Apesar dos resultados obtidos na cultura de *Spirogyra* sp. em manga não terem sido muito auspiciosos, outras observações realizadas durante este trabalho, levam a crer que se trata apesar de tudo de uma boa candidata para integrar sistemas de produção de etanol. A contribuir para esta afirmação estão por um lado, as produtividades muito semelhantes às de outras microalgas já estudadas e, por outro, o facto de se ter conseguido produzir, para o estudo dos métodos de ruptura, biomassa microalgal em que o teor em açúcares era de 38 % g eq_{glu.}·g biomassa⁻¹, valor obtido por HAQ.

Para que seja possível a produção de bioetanol a partir de hidrolisados de microalga, torna-se também necessário realizar estudos ao nível do processo fermentativo. Como a levedura *S. cerevisiae* não é um organismo promissor na fermentação de pentoses, açúcares monoméricos que parecem estar presentes nos hidrolisados de *Spirogyra* sp., neste estudo avaliou-se o desempenho de outras leveduras – *T. delbrueckii* e *S. carlsbergensis* face a diferentes açúcares. Constatou-se que, em meio sintético, as duas leveduras fermentam glucose e manose e conseguem metabolizar alguma arabinose. No entanto, nenhuma delas apresentou capacidade de degradar xilose e galactose.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram-se coerentes com os observados por outros autores que estudam esta e outras microalgas, mas muito permanece ainda por ser compreendido acerca da produção de açúcares nesta espécie. Por isso serão ainda necessários estudos adicionais que permitam avaliar e definir as condições de cultura que possibilitem a maximização da produtividade, quer em biomassa quer em açúcares, nomeadamente:

- Usando tipos de reactores diferentes dos usados neste estudo, que foram escolhidos por serem baratos e de fácil montagem e operação.
- Usando meios de cultura limitados em macronutrientes (azoto, fósforo ou enxofre) para tentar identificar qual o nutriente que nesta alga induz a acumulação de açúcares. A bibliografia refere que o conteúdo de açúcares acumulado pelas

microalgas aumenta consideravelmente após esgotamento de nitratos, mas neste estudo não foi possível confirmar se este é o caso da *Spirogyra* sp., pois a microalga apresentou um consumo de nitratos demasiado lento.

- Procurando um método que permita monitorizar diária e facilmente as células de microalga em relação à quantidade de açúcar.
- Testando microrganismos fermentativos para encontrar um que utilize hexoses e pentoses e seja resistente ao efeito de inibidores gerados pela degradação dos açúcares durante o processo de extracção.

Em suma, a implementação de bioetanol a partir de microalgas no mercado, não parece, por enquanto, um processo viável. Muitos estudos têm ainda que ser realizados, no sentido de tornar o cultivo, a colheita e o processamento da biomassa mais rentável, bem como o processo de fermentação alcoólica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aehle, W.; (2004); *Enzymes in Industry: Production and Applications*; 2nd Edition; Wiley-VCH;
- Agbor, V.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D.B.; (2011); *Biomass pretreatment: fundamentals toward application*; Biotechnology Advances 29, 675-685;
- Agarwal, A. K.; (2007); *Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines*; Energy and Combustion Science 33, 233-271;
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D.; (1989); *Molecular Biology of The Cell*; 2nd Edition; Garland Publishing, Inc; New York;
- Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J.; (2010); *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review*; Bioresource Technology 101, 4851-4861;
- Andrade, J. P.; Bispo, A. S. R.; Marbach, P. A. S.; Nascimento, R. P.; (2011); *Production and Partial Characterization of Cellulases from Trichoderma sp. IS-05 Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil*; Enzyme Research 2011, 1-7;
- Antunes, R.; Silva, I. C.; (2010); *Utilização de algas para a produção de biocombustíveis*. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Disponível online em http://www.marcasepatentes.pt/files/collections/pt_PT/1/300/302/Utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20algas%20para%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20biocombust%C3%ADveis.pdf; Acesso a 16/02/2011;
- Azov, Y.; (1982); *Effect of pH on Inorganic Carbon Uptake in Algal Cultures*; Applied and Environmental Microbiology 43(6), 1300-1306;
- Beer, L. L.; Boyd, E. S.; Peters, J. W.; Posewitz, M. C.; (2009); *Engineering algae for biohydrogen and biofuel production*; Current Opinion in Biotechnology 20, 264-271;
- Biocombustíveis (2011); Resumo Temático | Energia e Clima; BCSD Portugal – Conselho Empresarial para o Desenvolvimento Sustentável; Disponível online em: <http://www.wbcds.org/web/publications/Biofuels-Portuguese.pdf>; Acesso a 13/02/2011;
- Bioenergia – manual sobre tecnologias, projecto e instalação (2004); Disponível online em <http://pt.scribd.com/doc/23404175/Manual-Bioenergia>; Acesso a 18/02/2011;

- Biofuels Platform (2011); Disponível online em: <http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/eu-bioethanol.php>; Acesso a 15/08/2011;
- Blottnitz, H.; Curran, M. A.; (2007); *A review of assessments conducted on bio-ethanol as a transportation fuel from a net energy, greenhouse gas, and environmental life cycle perspective*; Journal of Cleaner Production 15, 607-619;
- Borowitzka, M.; (1999); *Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters*; Journal of Biotechnology 70, 313-321;
- Borowitzka, M. A.; Borowitzka, L. J.; (1988); *Micro-algal biotechnology*; Cambridge University Press; United Kingdom;
- Bouterfas, R.; Belkoura, M.; Dauta, A.; (2006); *The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake*; Limnetica 25(3), 647-656;
- Brányiková, I.; Marsáľková, B.; Doucha, J.; Brányik, T.; Bisová, K.; Zachleder, V.; Vítová, M.; (2011); *Microalgae-Novel Highly Efficient Starch Producers*; Biotechnology and Bioengineering 108, 766-776;
- Brennan, L.; Owende, P.; (2010); *Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products*; Renewable and Sustainable Energy Reviews 14, 557-577;
- Brodie, J.; Lewis, J.; (2007); *Unravelling the algae – The past, present and future of algae sustematics*; CRC Press; Boca Raton;
- Brown, S. W.; Oliver, S. G.; (1982); *The effect of temperature on the ethanol tolerance of the yeast Saccharomyces uvarum*; Biotechnology Letters 4, 269-274;
- Cano, R. J.; Colomé, J. S.; (1986); *Microbiology*; West Publishing Company; California;
- Carvalho, A. P.; Meireles, L. A.; Malcata, F. X.; (2006); *Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances*; Biotechnology Progress 22(6), 1490-1506;
- Chandel, A. K.; Kapoor, R. K.; Singh, A.; Kuhad, R. C.; (2007); *Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by Candida shehatae NCIM 3501*; Bioresource Technology 98(10), 1947-1950;

- Chisti, Y.; (2007); *Biodiesel from microalgae*; Biotechnology Advances 25, 294-306;
- Chisti, Y.; (2008); *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*; Trends in Biotechnology 26, 126-131;
- Choi, S. P.; Nguyen M. T.; Sim, S. J.; (2010); *Enzymatic pretreatment of Chlamydomonas reinhardtii biomass for ethanol production*; Bioresource Technology 101, 5330-5336;
- Debus, D.; Methner, H.; Schulze, D.; Dellweg, H.; (1983); *Fermentation of Xylose with the Yeast Pachysolen tannophilus*; Applied Microbiology and Biotechnology 17, 287-291;
- Directiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009;
- Dismukes, G. C.; Carrieri, D.; Bennette, N.; Ananyev, G. M.; Posewitz, M. C.; (2008); *Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels*; Current Opinion in Biotechnology 19, 235-240;
- Dongowski, G.; Lorenz, A.; Anger, H.; (2000); *Degradation of Pectins with Different Degrees of Esterification by Bacteroides thetaiotaomicron Isolated from Human Gut Flora*; Applied and Environmental Microbiology 66(4), 1321-1327;
- Doucha, J.; Lívanský, K.; (2009); *Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potencial productivity*; Journal of Applied Phycology 21, 111-117;
- Dubinsky, Z.; Rotem, J.; (1974); *Relations between Algal Populations and the pH of Their Media*; Oecologia 16, 53-60;
- Dubois, M.; Gilles, K. A. ; Hamilton, J. K. ; Rebers, P. A. ; Smith, F. ; (1956) ; *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*; Analytical Chemistry 28(3), 350-356;
- Eriksen, N. T.; Riisgard, F. K.; Gunther, W. S.; Lonsmann, I. J. J.; (2007); *On-line estimation of O₂ production, CO₂ uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor*; Journal of Applied Phycology 19, 161-174;
- Escobar, J. C.; Lora, E. S.; Venturini, O. J.; Yáñez, E. E.; Castillo, E. F.; Almazan, O.; (2009); *Biofuels: Environment, technology and food security*; Renewable and Sustainable Energy Reviews 13, 1275-1287;

- Eshaq, F. S.; Ali, M. N.; Mohd, M. K.; (2010); *Spirogyra biomass a renewable source for biofuel (bioethanol) production*; International Journal of Engineering Science and Technology 2(12), 7045-7054;
- Eshaq, F. S.; Ali, M. N.; Mohd, M. K.; (2011); *Production of Bioethanol from next generation feedstock alga Spirogyra species*. International Journal of Engineering Science and Technology 3(2), 1749-1755;
- Fernando, S.; Hall, C.; Jha, S.; (2006); *NO_x Reduction from Biodiesel Fuels*; Energy e Fuels 20, 376-382;
- Ferreira, W. F. C.; Sousa, J. C. F.; (1998); *Microbiologia – Volume 1*; Lidel; Lisboa;
- Ferrel, J.; Sarisky-Reed, V. S.; (2010); *National Algal Biofuels Technology Roadmap*; U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program;
- Fradique, M.; Batista, A. P.; Nunes, M. C.; Gouveia, L.; Bandarra, N. M.; Raymundo, A.; (2010); *Incorporation of Chlorella vulgaris and Spirulina máxima biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation*; Journal of the Science of Food and Agriculture 90, 1656-1664;
- Gírio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S.; Lukasik-Bogel, R.; (2010); *Hemicelluloses for fuel ethanol: A review*; Bioresource Technology 101, 4775-4800;
- Girisuta, B.; Janssen, L. P. B. M.; Heeres, H. J.; (2006); *A kinetic study on the decomposition of 5-hydroxymethylfurfural into levulinic acid*; Green Chemistry 8, 701-709;
- Gray, K. A.; Zhao, L.; Emptage, M.; (2006); *Bioethanol*; Current Opinion in Chemical Biology 10, 141-146;
- Gouveia, L.; (2011); *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*; Book SpringerBriefs.Springer Berlin Heidelberg Publisher.ISBN 978-3-642-17996-9 e-ISBN 978-3-642-17997-6. doi: [10.1007/978-3-642-17997-6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17997-6);
- Gouveia, L.; Coutinho, C.; Mendonça, E.; Batista, A. P.; Sousa, I.; Bandarra, N. M.; Raymundo, A.; (2008); *Functional biscuits with PUFA- ω 3 from Isochrysis galbana*; Journal of the Science of Food and Agriculture 88, 891-896;

- Gouveia, L.; Oliveira, A. C.; (2009); *Microalgae as a raw material for biofuels production*; Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36, 269-274;
- Griffiths, M. J.; Harrison, S. T. L.; (2009); *Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production*; Journal of Applied Phycology 21, 493-507;
- Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Lidén, G.; Zacchi, G.; (2006); *Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today*; Trends in Biotechnology 24(12), 549-556;
- Hahn-Hägerdal, B.; Karhumaa, K.; Fonseca, C.; Spencer-Martins, I.; Gorwa-Grauslund, M. F.; (2007); *Towards Industrial pentose-fermenting yeast strains*; Applied Microbiology Biotechnology 74, 937-953;
- Hainz, R.; Wöber, C.; Schagerl, M.; (2009); *The relationship between Spirogyra (Zygnematophyceae, Streptophyta) filament type groups and environmental conditions in Central Europe*; Aquatic Botany 91, 173-180;
- Harun, R.; Danquah, M. K.; (2011a); *Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production*; Process Biochemistry 46(1), 304-309.
- Harun, R.; Danquah, M. K.; (2011b); *Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production*; Chemical Engineering Journal 168(3), 1079-1084;
- Harun, R.; Danquah, M. K.; Forde, G. M.; (2010a); *Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production*; Journal of Chemical Technology and Biotechnology 85(2), 199-203;
- Harun, R.; Jason, W. S. Y.; Cherrington, T.; Danquah, M. K.; (2010b); *Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for bioethanol production*; Renewable and Sustainable Energy Reviews. doi:10.1016/j.rser.2010.07.071;
- Harun, R.; Singh, M.; Forde, G. M.; Danquah, M. K.; (2010c); *Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products*; Renewable and Sustainable Energy Reviews 14, 1037-1047;

- Harun, R.; Jason, W. S. Y.; Cherrington, T.; Danquah, M. K.; (2011); *Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production*; Applied Energy 88(10), 3464-3467;
- Hill, J.; Nelson, E.; Tilman, D.; Polasky, S.; Tiffany, D.; (2006); *Environmental, economic and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 11206-11210;
- Hill, J.; Polasky, S.; Nelson, E.; Tilman, D.; Huo, H.; Ludwig, L.; Neumann, J.; Zheng, H.; Bonta, D.; (2009); *Climate change and health costs of air emissions from biofuels and gasoline*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 2077-2082;
- Hirano, A.; Ueda, R.; Hirayama, S.; Ogushi, Y.; (1997); *CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation*; Energy 22 (2-3), 137-142;
- Hoebler, C.; Barry, J. L.; David, A.; Delort-Laval, J.; (1989); *Rapid Acid Hydrolysis of Plant Cell Wall Polysaccharides and Simplified Quantitative Determination of Their Neutral Monosaccharides by Gas-Liquid Chromatography*; Journal of Agricultural and Food Chemistry 37 (2), 360-367;
- Hossain, A. B. M. S. ; Salleh, A.; Boyce, A. N.; Chowdhury, P.; Naquiuddin, M.; (2008); *Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy*; American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4, 250-254;
- Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M.; Darzins, A.; (2008); *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*; The Plant Journal 54, 621-639;
- Ishida, N.; Mitamura, O.; Nakayama, M.; (2006); *Seasonal variation in biomass and photosynthetic activity of epilithic algae on a rock at the upper littoral area in the north basin of Lake Biwa, Japan*; Limnology 7, 175-183;

- John, R. P.; Anisha, G. S.; Nampoothiri, K. M.; Pandey, A.; (2011); *Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol*; Bioresource Technology 102(1), 186-193;
- Jordan, E. G.; (1970); *Ultrastructural Aspects of Cell Wall Synthesis in Spirogyra*; Protoplasma 69, 405-416;
- Kim, G. H.; Yoon, M.; Klotchkova, T. A.; (2005); *A Moving Mat: Phototaxis in the Filamentous Green Algae Spirogyra (Chlorophyta, Zygnemataceae)*; Journal of Phycology 41(2), 232-237;
- Kotay, S. M.; Das, D.; (2008); *Biohydrogen as a renewable energy resource – Prospects and potentials*; Internacional Journal of Hydrogen Energy 33, 258-263;
- Krall, S. M.; McFeeters, R. F.; (1998); *Pectin Hydrolysis: Effect of Temperature, Degree of Methylation, pH, and Calcium on Hydrolysis Rates*; Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 1311-1315;
- Lardon, L.; Hélias, A.; Sialve, B.; Steyer, J. P.; Bernard, O.; (2009); *Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae*; Environmental Science and Technology 43(17), 6475-6481;
- Lee, J. Y.; Yoo, C.; Jun, S. Y.; Ahn, C. Y.; Oh, H. M.; (2010); *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae*; Bioresource Technology 101, S75-S77;
- Lee, K.; Lee, C. G.; (2001); *Effect of Light/Dark Cycles on Wastewater Treatments by Microalgae*; Biotechnology Bioprocess Engineering 6, 194-199;
- Lee, Y. C.; Chang, S. P.; (2011); *The biosorption of heavy metals from aqueous solution by Spirogyra and Cladophora filamentous macroalgae*; Bioresource Technology 102(9), 5297-5304;
- Li, Y.; Horsman, M.; Wu, N.; Lan, Q. C.; Dubois-Calero, N.; (2008); *Biofuels from Microalgae*; Biotechnology Progress 24, 815-820;

- Maeda, I.; Seto, Y.; Ueda, S.; Cheng, Y.; Hari, J.; Kawase, M.; Miyasaka, H.; Yagi, K.; (2006); *Simultaneous Control of Turbidity and Dilution Rate Through Adjustment of Medium Composition in Semi-Continuous Chlamydomonas Cultures*; Biotechnology and Bioengineering 94(4), 722-729;
- Mahendra, J.; (2008); *Algae: Ulothrix, Spirogyra, Volvox*, Competition Science Vision 123; 383-386;
- Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S.; (2010); *Microalgae for biodiesel production and other applications: a review*; Renewable and Sustainable Energy Reviews 14, 217-232;
- Mayumi, K.; (1991); *Temporary emancipation from land: from the industrial revolution to the present time*; Ecological Economics 4, 35-56;
- Miller, G. L.; (1959); *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*; Analytical Chemistry 31(3), 426-428;
- Miranda, J. R. P. C.; (2011); *Produção de Bioetanol a Partir da Microalga Scenedesmus obliquus*; Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Energia e Bioenergia; FCT-UNL; Caparica;
- Mojović, L.; Nicolić, S.; Rakin, M.; Vukasinović, M.; (2006); *Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates*; Fuel 85, 1750-1755;
- Molina-Grima, E.; Belarbi, E. H.; Acien-Fernandéz, F. G.; Robles Medina, A.; Chisti, Y.; (2003); *Recovery of microalgae biomass and metabolites: process options and economics*; Biotechnology Advances 20, 491-515;
- Mussato, S. I.; Dragone, G.; Guimarães, P. M. R.; Silva, J. P. A.; Carneiro, L. M.; Roberto, I. C.; Vicente, A.; Domingues, L.; Teixeira, J. A.; (2010); *Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production*; Biotechnology Advances 28, 817-830;
- Naik, S.N.; Goud, V.V.; Rout, P.K.; Dalai, A.K.; (2010); *Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review*; Renewable and Sustainable Energy Reviews 14, 578-597;

- Nguyen; Thu, M.; Choi, S. P.; Lee, J.; Lee, J. W.; Sim, S. J.; (2009); *Hydrothermal Acid Pretreatment of Chlamydomonas reinhardtii Biomass for Ethanol Production*; Journal of Microbiology and Biotechnology 19(2), 161-166;
- Nigam, P. S.; Singh, A.; (2011); *Production of liquid biofuel from renewable resources*; Progress in Energy and Combustion Science 37, 52-68;
- Olaizola, M.; (2003); *Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace*; Biomolecular Engineering 20, 459-466;
- Olguin, E. J.; Galicia, S.; Angulo-Guerrero, O.; Hernández, E.; (2001); *The effect of low Light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of Spirulina sp. (Arthrospira) grown on digested pig waste*; Bioresource Technology 77, 19-24;
- Parmentier (1999); Micscape Magazine; *Spirogyra*; Disponível online em: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjan99/gyra.html>. Acesso a 26/02/2011;
- Patil, V.; Tran, K. Q.; Gislerod, H. R.; (2008); *Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae*; International Journal of Molecular Sciences 9, 1188-1195;
- Pittman, J. K.; Dean, A. P.; Osundeko, O.; (2011); *The potencial of sustainable algal biofuel production using wastewater resources*; Bioresource Technology 102, 17-25;
- Prescott, L. M.; Klein, D. A.; Harley, J. P.; (2002); *Microbiology*; 5th Edition, McGraw-Hill;
- Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Kumar, N. A.; Sridhar, S.; Rengasamy, R.; (2008); *A perspective on the biotechnological potencial of microalgae*. Critical Reviews in Microbiology 34(2), 77-88;
- Rehm, H.; J.; Reed, G.; (1981); *Biotechnology, Volume 1 – Microbial Fundaments*; Verlag Chemie; Weinheim;
- Renaud, S. M.; Thinh, L. V.; Lambrinidis, G.; Parry, D. L.; (2002); *Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures*; Aquaculture 211, 195-214;

- Richmond, A.; (2004); *Handbook of Microalgal Culture – Biotechnology and Applied Phycology*; Blackwell Science Publishing;
- Rosenberg, J. N.; Oyler, G. A.; Wilkinson, L.; Betenbaugh, M. J.; (2008); *A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution*; Current Opinion in Biotechnology 19, 430-436;
- Sammlung von Algenkulturen Göttingen (SAG) (2011); Disponível online em: http://www.epsag.uni-goettingen.de/cgi-bin/epsag/website/cgi/show_page.cgi?kuerzel=about; Acesso a 26/02/2011;
- Sander, K.; Murthy, G.; (2009); *Enzymatic Degradation of Microalgal Cell Walls*; ASABE Annual International Meeting, Nevada, Paper N° 1035636;
- Schenk, P. M.; Thomas-Hall, S. R.; Stephens, E.; Marx, U.C.; Mussgnug, J. H.; Posten, C.; Kruse, O.; Hankamer, B.; (2008); *Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production*; Bioenergy Research 1(1), 20-43;
- Sialve, B.; Bernet, N.; Bernard, O.; (2009); *Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgae biodiesel sustainable*; Biotechnology Advances 27, 409-416;
- Simons, J.; van Beem, A. P.; (1990); *Spirogyra species and accompanying algae from pools and ditches in The Netherlands*; Aquatic Botany 37, 247-269;
- Smith, J.; Hong-Shum, I.; (2003); *Food Additives Databook*, 2nd Edition; Wiley-Blackwell; p. 248;
- Stanier, R. Y.; Doudoroff, M.; Adelberg, E. A.; (1970); *The microabial world*; 3rd Edition; Prentice-Hall, Inc.; Englewood Cliffs, New Jersey;
- Sulfahri; Mushlihah, S.; Sunarto, E.; Irvansyah, M. Y.; Utami, R. S.; Mangkoedihardjo, S.; (2011); *Ethanol Production from Algae Spirogyra with Fermentation by Zymomonas mobilis and Saccharomyces cerevisiae*; Journal of Basic and Applied Scientific Research 1(7), 589-593;

- Tanaka, K.; Kato, S.; Yomo, S.; (1977); *Studies on the growth and development in Spirogyra III. Three types in the pattern of diurnal movement of Spirogyra filaments and transformation of the movement pattern by DCMU*; Plant Science Letters 10, 31-39;
- Tavares, J. E. B.; (2009); *Cultivo de microalgas do género Botryococcus visando a produção de biodiesel*. Tese para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e Biotecnologia; FC-UL; Lisboa;
- Tsukahara, K.; Sawayama, S.; (2005); *Liquid Fuel Production Using Microalgae*; Journal of the Japan Petroleum Institute 48, 251-259;
- Ueda, R.; Hirayama, S.; Sugata, K.; Nakayama, H.; (1996); *Process for the production of ethanol from microalgae*; US Patent 5,578,472;
- Ueno, Y.; Kurano, N.; Miyachi, S.; (1998); *Ethanol Production by Dark Fermentation in the Marine Green Alga, Chlorococcum littorale*; Journal of Fermentation and Bioengineering 86(1), 38-43;
- UTEX The Culture Collection of Algae (2011); Disponível online em: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/default.aspx>; Acesso a 18/02/2011;
- Wang, C. Y.; Fu, C. C.; Liu, Y. C.; (2007); *Effect of using light-emitting diodes on the cultivation of Spirulina platensis*; Biochemical Engineering Journal 37(1), 21-25;
- Wang, J. C.; Hoshaw, R. W.; McCourt, R. M.; (1989); *Diversity of Spirogyra (Chlorophyta) filament types on an altitudinal gradient*; British Phycological Journal 24(4), 367-373;
- Wang, T.; Jónsdóttir, R.; Kristinsson, H. G.; Hreggvidsson, G. O.; Jónsson, J. O.; Thorkelsson, G.; Ólafsdóttir, G.; (2010); *Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae Palmaria palmate*; Food Science and Technology 43, 1387-1393;

Winkler, E.; Foidl, N.; Gubitz, G.; Staubmann, R.; Steiner, W.; (1997);
Enzyme-Supported Oil Extraction from Jatropha curcas Seeds; Applied
Biochemistry and Biotechnology 63-65, 449-456.

Fonte de imagens:

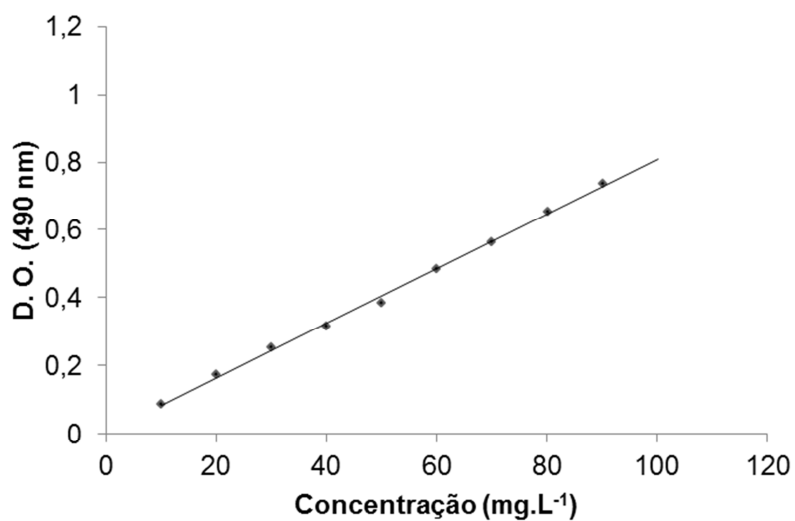
<http://www.education.nic.in/cd50years/q/6j/BM/6JBM0101.htm>; Acesso a 13/05/2011;

<http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/2152/lb3pg5.htm>; Acesso a 13/05/2011;

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin>; Acesso a 10/09/2011;

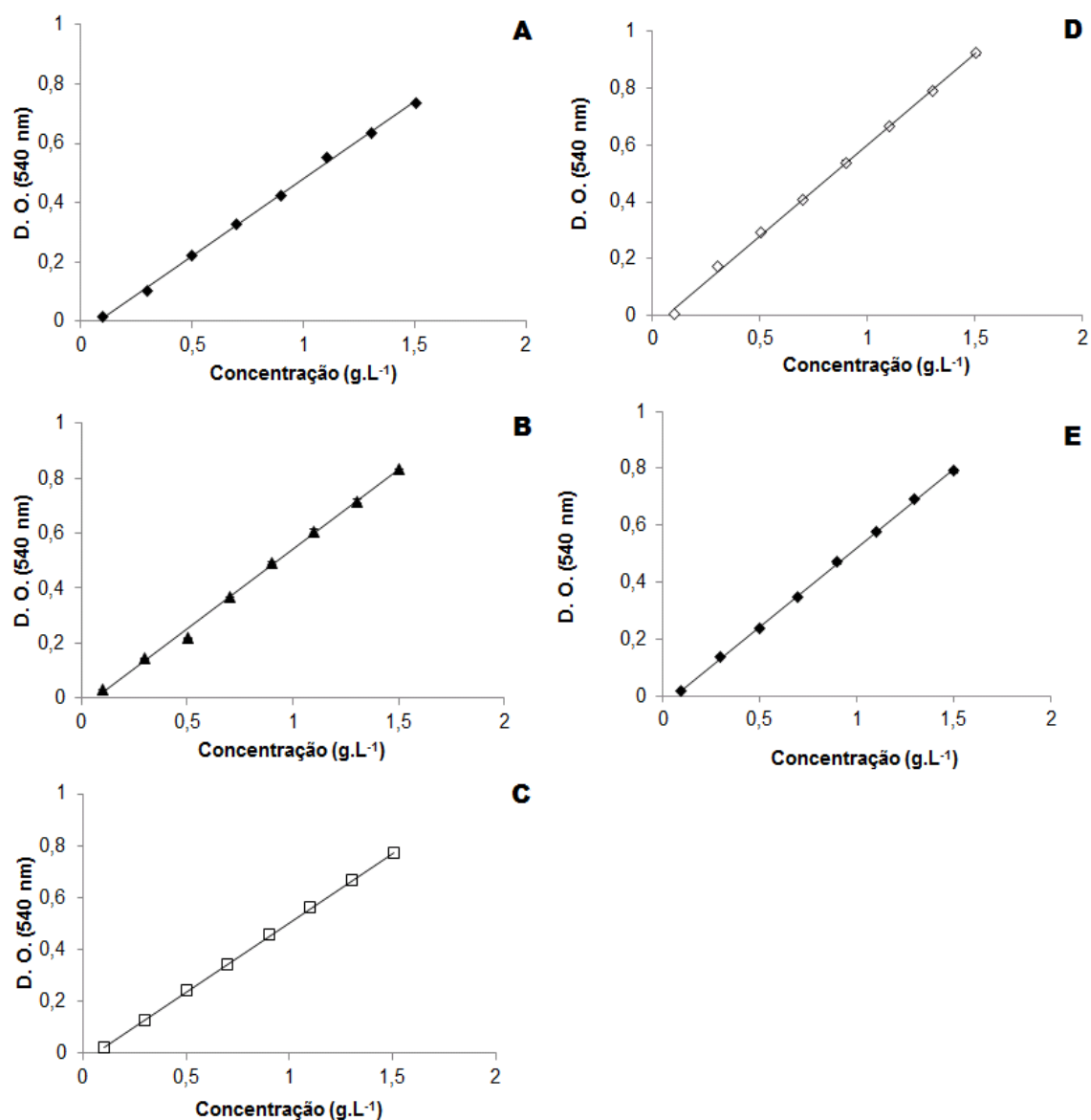
ANEXOS

ANEXO I – Rectas de calibração para os diferentes métodos de avaliação do teor em açúcares totais com reagente FS e açúcares redutores com o reagente de DNS.



Método de Análise	Declive da Recta	Ordenada na Origem	R ²
FS	0,0081	0,0026	0,9979

Figura I.1 – Recta de calibração para a glucose no método do FS. Os resultados representam a média de determinações, em duplicado.



Método de Análise	Açúcar	Declive da Recta	Ordenada na Origem	R ²
DNS	Glucose	0,5216	0,0415	0,9987
	Xilose	0,5808	0,0399	0,9977
	Manose	0,5350	0,0301	0,9999
	Arabinose	0,6398	0,0384	0,9986
	Galactose	0,5552	0,0354	0,9994

Figura I.2 – Rectas de calibração para os açúcares utilizados nos ensaios de fermentação no método do DNS. Os resultados representam a média de determinações em duplicado.

ANEXO II - Reagentes Químicos

Quadro 1.1 - Lista dos reagentes químicos utilizados ao longo do trabalho experimental. (AR – açúcares redutores; AT – açúcares totais; CA – cultura de algas; CI – cromatografia iônica; RC – ruptura celular; CL – cultura de leveduras; DE – determinação de etanol; HPLC – cromatografia líquida de alta pressão).

Nome	Fórmula	Peso Molecular	Pureza	Outras características	Marca	Utilização
2-Propanol	C_3H_8O	60,10	p.a.	99 %	<i>Merck</i>	DE
5-Hidroximetil-furfural	$C_6H_6O_3$	126,11	p.a.	99 %	<i>Sigma</i>	HPLC
Ácido 3,5-dinitrossalicílico	$C_7H_6O_5 \cdot H_2O$	228,12	puro	-	<i>Merck</i>	AR
Ácido acético glacial	$C_2H_4O_2$	60,05	HPLC grade	> 99,8 %	<i>Scharlau</i>	HPLC
Ácido butírico	$C_4H_8O_2$	88,11	puríssimo	99,5 %	<i>Fluka</i>	HPLC
Ácido fórmico	CH_2O_2	46,03	p.a.	98 %	<i>Merck</i>	HPLC
Ácido láctico	$C_3H_6O_3$	90,08	p.a.	98 %	<i>Sigma</i>	HPLC
Ácido levulínico	$C_5H_8O_3$	116,12	p.a.	98 %	<i>Sigma</i>	HPLC
Ácido propiónico	$C_3H_6O_2$	74,08	p.a.	99 %	<i>Sigma</i>	HPLC
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	98,08	p.a.	95 – 98 %	<i>Sigma</i>	AT RC
Agar	-	-	-	-	<i>Merck</i>	CL
Azida de sódio	NaN_3	65,01	p.a.	99 %	<i>Merck</i>	RC
Bacto-Peptona	-	-	-	-	<i>Cultimed</i>	CL
Bicarbonato de sódio	$NaHCO_3$	84,01	p.a.	99,5 %	<i>Fluka</i>	CI
Carbonato de sódio	Na_2CO_3	105,99	p.a.	99,5 %	<i>Fluka</i>	CI
Celobiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,30	p.a.	98 %	<i>Merck</i>	HPLC
Cloreto de cálcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147,01	p.a.	99 %	<i>Riedel-de-Haën</i>	CA
Cloreto de cobalto hexahidratado	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	237,93	-	99 %	<i>Merck</i>	CA

Nome	Fórmula	Peso Molecular	Pureza	Outras características	Marca	Utilização
Cloreto de ferro hexahidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	270,30	p.a	99 %	<i>Merck</i>	CA
Cloreto de manganês tetra hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	197,91	p.a.	99 %	<i>Riedel-de-Haën</i>	CA
Cloreto de sódio	NaCl	58,44	p.a.	99,5	<i>Fisher-Scientific Fluka</i>	CA; CI
Cloreto de zinco	ZnCl_2	136,32	-	-	-	CA
D-Arabinose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	150,13	p.a.	99 %	<i>Sigma</i>	CL HPLC
D-Galactose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	p.a.	98 %	<i>Sigma</i>	CL HPLC
D-Glucose anidra	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	p.a.	99,5 %	<i>Pronalab</i>	CL HPLC
Dihidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	136,09	p.a.	99 %	<i>Riedel-de-Haën</i>	CA CL
D-Manose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	p.a.	99 %	<i>Sigma</i>	CL
D-Xilose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	150,13	Fins bio-químicos	99 %	<i>Merck</i>	CL HPLC
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	46,07	p.a.	99,5 %	<i>Panreac</i>	DE
Extracto de levedura	-	-	-	-	<i>Biokar-Diagnostics</i>	CL
Extracto de malte	-	-	-	-	<i>Difco</i>	CL
Fenol	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	94,11	p.a.	-	<i>Merck</i>	AT
Fosfato de potássio monobásico	K_2HPO_4	174,18	p.a	99 %	<i>Sigma</i>	CA CI
Furfural	$\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$	96,08	p.a.	99 %	<i>Sigma</i>	HPLC
Hidróxido de sódio	NaOH	40,04	p.a.	puro	<i>JMS</i>	AR

Nome	Fórmula	Peso Molecular	Pureza	Outras características	Marca	Utilização
Molibdato de sódio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241,95	p.a.	99,5 %	<i>Merck</i>	CA
Nitrato de sódio	NaNO_3	84,99	p.a.	99,5 %	<i>Merck</i>	CA CI
Nitrito de sódio	NaNO_2	69,00	p.a.	99 %	<i>Fluka</i>	CI
Sal dissódico do ácido etilenodiamina-tetracético dihidratado	$\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8$	372,24	p.a.	99 %	<i>Panreac</i>	CA
Sulfato de amónio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132,14	p.a.	99 %	<i>Riedel-de-Haën</i>	CL
Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,48	p.a.	99,5 %	<i>Merck</i>	CA CL
Sulfato de sódio	Na_2SO_4	142,04	p.a.	99 %	<i>Sigma</i>	CI
Tartarato duplo de sódio e potássio	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	282,23	p.a.	99 %	<i>Panreac</i>	AR
Vitamina B1	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{SN}_4\text{ClO}$	337,27	p.a.	98,5 %	<i>BDH Chemicals</i>	CA
Vitamina B12	$\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$	1355,39	p.a.	95 %	<i>Biochemical</i>	CA
Vitamina B6	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	205,64	p.a.	-	<i>RedStar Chemical</i>	CA